



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

Controlo de *Conyza bonariensis* resistente ao glifosato

Manuel Daniel Felizes Simões dos Santos

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica – Protecção das Plantas

Orientadora: Professora Doutora Ana Maria da Silva Monteiro
Co-orientadora: Doutora Isabel Maria Silva Monteiro Miranda Calha

Júri:

Presidente: Doutor José Carlos Augusta da Costa, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria José Antão Pais de Almeida Cerejeira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
Doutora Ana Maria da Silva Monteiro, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
Doutora Isabel Maria Silva Monteiro Miranda Calha, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária;
Doutor João Martim de Portugal e Vasconcelos Fernandes, Professor Adjunto da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja.

Lisboa, 2012

Agradecimentos

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À minha família, por tudo o que fizeram por mim, sem eles nada disto seria possível.

À Professora Ana Monteiro, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo deste trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À Doutora Isabel Calha, minha co-orientadora, pela competência científica e orientação dada, e que me ensinou parte do que sei, bem como pela disponibilidade demonstrada.

À Engenheira Susana Luz e à Teresa Santos do Laboratório de Resíduos e Pesticidas (LRP) do INIAV I. P. pela colaboração na implementação do ensaio de determinação de shiquimato.

À Lurdes Silva, Margarida Barreto e Pedro Moutinho, na manutenção dos ensaios de estufa.

Ao meu colega Filipe Cruz, que me acompanhou nesta etapa e me ajudou na realização deste trabalho, bem como a todos os meus amigos e colegas.

E a todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para que esta dissertação se tornasse realidade, o meu muito obrigado.

Resumo

O objetivo deste trabalho consistiu na determinação da eficácia do glifosato em duas populações de *Conyza bonariensis*, uma suspeita de resistência (B8) e outra suscetível (C) provenientes dum olival do Alentejo. Assim, realizaram-se ensaios de germinação em meio agar, ensaios de dose-resposta ao glifosato em placa de petri com diferentes concentrações de glifosato e ensaios em estufa (1) e em laboratório (2) para confirmar e caracterizar a resistência ao glifosato e (2) para determinar diferenças de acumulação de shiquimato. A população B8 apresentou taxas de germinação e de emergência significativamente superiores às da população C mas menores taxas de mortalidade. O ensaio de dose-resposta ao glifosato evidenciou que a população B8 tinha duas a três vezes menor sensibilidade ao glifosato do que a população C. O ensaio de dose-resposta ao flazasulfurão com planta inteira no estado de roseta evidenciou eficácia total em ambas as populações. A acumulação de shiquimato, 72-h após aplicação, foi superior na população resistente, para a dose recomendada mas foi inferior para a dose de 360 g ha^{-1} . Os resultados destes ensaios indiciam que a população B8 é resistente ao glifosato e que o flazasulfurão constitui uma alternativa ao glifosato para o controlo químico de populações resistentes.

Palavras-chave: *Conyza bonariensis*, shiquimato, flazasulfurão, glifosato, resistência.

Abstract

The objective of this study was to determine the efficacy of this herbicide in two populations of *Conyza bonariensis*, one suspected of resistance (B8) and a susceptible one (C), from olive groves and citrus orchards in Alentejo, south of Portugal. Assays were performed on germination agar medium, glyphosate dose-response assays in petri dishes with different concentrations of glyphosate and a greenhouse (1) and laboratory (2) study were conducted (1) to confirm and characterize glyphosate resistance and (2) to determine whether resistant and susceptible populations have differential shikimate accumulation. Population B8 showed significant higher germination and emergence than population C but lower mortality rate. Dose-response studies revealed that the suspected resistant population was two- to three-fold less sensitive to glyphosate than the susceptible population. The dose-response flazasulfuron assay with whole plant in the rosette stage revealed the doses were completely effective on both populations. Shikimate accumulation was higher in resistant population at 72-h after treatment, for the recommended concentration of glyphosate. However, it was lower for concentrations of 360 g ha⁻¹. These results pointed that population B8 is resistant to glyphosate and flazasulfuron is an option for the chemical control of resistant populations.

Key words: *Conyza bonariensis*, shikimate, flazasulfuron, glyphosate, resistance.

Extended Abstract

Weeds are plants whose purposes have not yet been discovered or that negatively interfere in the activities of man, growing where it is not desired, causing crop damage and compromising agricultural production.

These weeds can germinate, grow, develop and reproduce in unfavorable environmental conditions and are a serious problem for agriculture because they grow well in conditions similar to those of cultivated plants.

Among the many problems that mitigate the low yield of a crop, the occurrence of weeds is probably the most important factor to increased losses.

Conyza bonariensis L. Cronq. is considered a weed. Control of this weed as well as others, has been mainly made on the basis of herbicides, in particular glyphosate.

The selection pressure caused by herbicides in weed populations has led to the selection of resistant populations of plants in agriculture. In this context fits the *C. bonariensis*, which has some genotypes resistant to EPSPS inhibiting herbicides, where glyphosate belongs.

The use of glyphosate in citrus orchards and olive groves in Alentejo has favored the increase of selection pressure, which, coupled with good ecological adaptability of *C. bonariensis* systems for reduced tillage, contributes to the selection of resistant biotypes of this species.

The main objective of this work was to confirm resistance to glyphosate on one population of *C. bonariensis* suspected of resistance (B8). A susceptible one, with no previous history of glyphosate application, was used as reference (C).

Plant material was obtained from seeds collected in weed populations growing in olive groves and citrus orchards in Alentejo, south of Portugal.

Greenhouse and laboratory experiments were conducted to investigate differences in glyphosate susceptibility among those two populations of *C. bonariensis* introduced as weed in Portugal.

The following assays were performed: i) seed germination in agar medium; ii) glyphosate dose-response assays in petri dishes with glyphosate at concentrations of 0.05; 0.1; 0.2; 0.3 and 0.4 mg.mL⁻¹ and iii) dose-response assays with whole plant in the rosette stage with glyphosate at concentrations of 180, 360, 720, 1440, 2880 and 5760 g.ha⁻¹ and flazasulfuron at concentrations of 10, 20, 40, 80, 160 e 360 g. ha⁻¹ performed and iv) and a shikimate bioassay was implemented after application of two doses (360 g s.a.L-1 (0,5 N) and 720 g s.a.L-1 (N)) of glyphosate in both populations to verify the increase of shikimate levels over time.

Germination testes in agar showed significant higher germination and emergence but lower mortality of the population B8.

The dose-response glyphosate bioassay with whole plant showed a level of resistance (NR) of 2,0 to 3,2 on the analysis of the green weight and 2,1 and 3,3 in dry weight analysis. These results indicate that glyphosate should be applied twice or three times that the recommended dose for controlling *C. bonariensis* R.

The dose-response flazasulfuron assay with whole plant in the rosette stage revealed the doses were completely effective on both populations.

Dose-response assays in Petri dishes with concentrations of 0.05; 0.1; 0.2; 0.3 and 0.4 mg.mL⁻¹ of glyphosate and monitoring of the germination, emergence, and mortality of the species under study. In general, there was a higher germination and emergence of the population B8 and higher mortality rate for the population C. There were no evidences of significant differences between populations for germination and emergence, which seems to indicate that the different concentrations may not influence these parameters. However, the mortality rate seems to be correlated with the concentration of glyphosate applied, because there was higher mortality for higher concentrations of the herbicide.

A shikimate bioassay was implemented after application of two doses (360 g s.a.L⁻¹ (0,5 N) and 720 g s.a.L⁻¹ (N)) of glyphosate in both populations to verify the increase of shikimate levels over time. The population B8 always presented higher concentrations of shikimate for the recommended dose (N) and slightly lower for the sub-lethal dose (0,5N). The results of these tests allowed realizing that there is a greater efficacy of glyphosate on population C, compared with the population B8.

The highest germination rate associated with a resistant population, suggests that the farmer should be able to control these populations more effectively through the use of herbicides with different modes of action and cultural practices.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Extended Abstract.....	IV
Índice de Figuras.....	VIII
Índice de Quadros.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XI
I. Introdução.....	1
II. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Resistência adquirida a herbicidas.....	4
2.1.1. Definição de resistência.....	4
2.1.2. Principais fatores de resistência adquirida a herbicidas.....	5
2.1.3. Estratégias de controlo ou prevenção de resistência adquirida.....	11
2.2. Glifosato.....	16
2.2.1. Modo de ação e comportamento na planta.....	16
2.2.2. Comportamento no ambiente.....	22
2.2.3. Mecanismos de resistência adquirida.....	25
2.2.4. Resistência adquirida ao glifosato no mundo.....	27
2.3. Avoadinha-peluda (<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronq.).....	28
2.3.1. Classificação, origem e distribuição.....	28
2.3.2. Características botânicas.....	29
2.3.3. Germinação e dormência.....	29
2.3.4. Resistência a herbicidas.....	33
2.4. O herbicida flazasulfurão como alternativa ao glifosato.....	34
2.4.1. Modo de ação e comportamento na planta.....	34
2.4.2. Comportamento no ambiente.....	36
2.4.3. Mecanismos de resistência adquirida a sulfonilureias.....	37
III. Material e Métodos.....	39
3.1. Germinação de sementes de populações de <i>C. bonariensis</i> suscetíveis e resistentes ao glifosato.....	40
3.2. Ensaio de dose-resposta ao glifosato.....	40
3.2.1. Ensaio em placa de petri.....	40
3.2.2. Ensaio com planta inteira.....	41
3.3. Ensaio de dose-resposta ao flazasulfurão com planta inteira.....	41
3.4. Ensaio de determinação do shiquimato.....	41
3.5. Análise de dados.....	42
IV. Resultados e Discussão.....	44
4.1. Germinação de sementes de duas populações de <i>C. bonariensis</i>	44
4.2. Ensaio de dose-resposta ao glifosato em placa de petri.....	45

4.3.	Ensaio de dose-resposta ao glifosato com planta inteira.....	52
4.4.	Ensaio de dose-resposta ao flazasulfurão com planta inteira.....	55
4.5.	Ensaio de determinação de shiquimato.....	56
V.	Conclusão.....	59
	Referências Bibliográficas.....	60
	Anexos	

Índice de Figuras

Figura 1. Germinação acumulada em meio agar de sementes de duas populações de <i>Conyza bonariensis</i> R (B8) e S (C) provenientes do Alentejo.....	44
Figura 2. Germinação acumulada das sementes da população B8 em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).....	46
Figura 3. Germinação acumulada das sementes da população C em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).....	46
Figura 4. Emergência acumulada das sementes da população B8 em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).....	48
Figura 5. Emergência acumulada das sementes da população C em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).	48
Figura 6. Mortalidade acumulada das sementes da população B8 em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).....	50
Figura 7. Mortalidade acumulada das sementes da população C em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).....	50
Figura 8. Curvas de dose-resposta ao glifosato de duas populações de <i>C. bonariensis</i> : B8 (suspeita de resistência) e C (suscetível usada como referência). A dose N (dose recomendada) corresponde a 720 g ha^{-1} de glifosato (primeiro ensaio).....	53
Figura 9. Curvas de dose-resposta ao glifosato de duas populações de <i>C. bonariensis</i> : B8 (suspeita de resistência) e C (suscetível usada como referência). A dose N (dose recomendada) corresponde a 720 g ha^{-1} de glifosato (segundo ensaio).....	54
Figura 10. Curvas de dose-resposta ao flazasulfurão de duas populações de <i>C. bonariensis</i> : B8 e C. A dose N (dose recomendada) corresponde a 40 g ha^{-1} de flazasulfurão.....	56
Figura 11. Acumulação de shiquimato endógeno em duas populações de <i>C. bonariensis</i> : B8 (R) e C (S) em plantas testemunha. 1-24h; 2-48h; 3-72h após aplicação de glifosato.....	57

Figura 12. Acumulação de shiquimato endógeno em duas populações de *C. bonariensis*: B8 (R) e C (S). 1-24h; 2-48h; 3-72h após aplicação de glifosato; 0,5N-360 g.ha⁻¹; N-720 g.ha⁻¹57

Índice de Quadros

Quadro 1. Germinação de sementes de duas populações de <i>Conyza bonariensis</i> . * - homogeneidade de variâncias entre as populações B8 e C, para cada concentração: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre modalidades ($p < 0,05$).....	45
Quadro 2. Efeito da concentração de glifosato na germinação. de sementes de duas populações de <i>Conyza bonariensis</i> - média (erro padrão) -. * - homogeneidade de variâncias entre as populações B8 e C, para cada concentração: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre modalidades ($p < 0,05$).....	47
Quadro 3. Efeito da concentração de glifosato na emergência de duas populações de <i>Conyza bonariensis</i> -média (erro padrão) –. * - homogeneidade de variâncias entre as populações B8 e C, para cada concentração: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre modalidades ($p < 0,05$).....	49
Quadro 4. Efeito da concentração de glifosato na mortalidade de duas populações de <i>Conyza bonariensis</i> -média (erro padrão); ns – diferenças não significativas; s – diferenças significativas; * - homogeneidade de variâncias entre as populações B8 e C, para cada concentração: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre modalidades ($p < 0,05$).....	51
Quadro 5. ED50 e Nível de resistência para o peso verde e o peso seco (g) de duas populações de <i>C. bonariensis</i> relativos ao primeiro ensaio de glifosato.....	53
Quadro 6. ED50 e Nível de resistência para o peso verde e o peso seco (g) de duas populações de <i>C. bonariensis</i> relativos ao segundo ensaio de glifosato.....	54

Lista de Abreviaturas

ACCase: Acetyl-CoA carboxilase

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALS: Acetolactato sintase

AMPA: Ácido aminometilfosfónico

DAA: Dias após aplicação

ED₅₀: Dose efetiva média

EPSPS: 5-*enol*-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintase

FEN: Fenilalanina

GM: Cultura geneticamente modificada

GR: Cultura resistente ao glifosato

IAA: Ácido idolacético

IAN: Indol-3-acetonitrila

LRP: Laboratório de resíduos e pesticidas

KARI: Aceto ácido redutor isomerase

MOA: Modo de ação

PEP: Fosfoenolpiruvato

P: Fósforo

PAI: Período anterior à interferência

PCPI: Período crítico de prevenção da interferência

Pi: Fosfato inorgânico

PHE: Fenilalanina

ppm: Partes por milhão

PTPI: Período total de prevenção da interferência

S3P: Shiquimato-3-fosfato

TAM: Triptamina

THF: Tetrahidrofolato

TRP: Triptofano

TYR: Tirosina

I. Introdução

Os herbicidas contribuíram bastante para o aumento de produção de alimentos a nível mundial, de uma forma eficiente, económica e ambientalmente sustentável. O glifosato foi desenvolvido em 1970 e colocado no mercado em 1974 com o nome comercial de Roundup® pela empresa Monsanto Company (St. Louis, MO), para uso em terras cultivadas e não cultivadas. Com a introdução de culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato (GM) na década de 1990, esta substância ativa passou a ser utilizada em larga escala no controlo de plantas infestantes em culturas resistentes ao glifosato (GR), provavelmente de forma pouco consciente relativamente aos danos que poderia causar no ambiente. No entanto, a aplicação repetida do mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo modo de ação, contribuíram para a ocorrência do fenómeno de resistência a herbicidas, incluindo o glifosato, em diversas espécies infestantes (Nandula, 2010).

Por definição, as infestantes são o conjunto de espécies vegetais que crescem nos locais em que não se pretende que surjam. A sua presença é indevida, uma vez que competem com as plantas cultivadas na obtenção de água, luz e nutrientes. Além de servirem, igualmente, de abrigo a determinadas pragas e doenças que podem ser prejudiciais à cultura.

O glifosato é um herbicida não-seletivo utilizado para controlar plantas infestantes. A avoadinha-peluda (*Conyza bonariensis* (L.) Cronquist) é uma espécie infestante que se encontra espalhada um pouco por todo o território de Portugal (Franco, 1984) bem como por todo o mundo e é normalmente controlada com glifosato. Nos últimos anos, plantas de *C. bonariensis* têm apresentado poucos sintomas de toxicidade em resposta ao tratamento com glifosato, no Brasil, dando a entender que estas plantas são resistentes ao herbicida (Vargas *et al.*, 2007).

O género *Conyza* inclui, aproximadamente, 50 espécies, que se distribuem em quase todo o mundo. Uma das espécies que mais se destaca, pelo seu carácter negativo, relativamente à sua elevada capacidade infestante, é a *Conyza bonariensis*. É uma espécie nativa da América do Sul, pertencente à família Asteraceae e que se encontra abundantemente na Argentina, no Uruguai, no Paraguai e no Brasil. Também se encontra na Colômbia e na Venezuela, onde infesta culturas de café (Kissmann e Groth, 1999).

A espécie *C. bonariensis*, conhecida por avoadinha-peluda, destaca-se por infestar áreas abandonadas (terrenos baldios e margens de estradas), pastagens, culturas perenes (pomares de citrinos, olival e vinha no caso de Portugal) e culturas anuais (algodão, hortícolas, milho, soja e trigo) (Thebaud e Abbott, 1995). Em termos mundiais, esta espécie infesta mais de 40 culturas. Na vinha, a *Conyza* spp. encontra-se, principalmente, como infestante anual de inverno. Na cenoura e na cebola ocorre como anual de verão, após a cultura de inverno. Na cenoura, os seus efeitos na eficiência da colheita são mais prejudiciais do que na produtividade da cultura, tendo em vista que os caules e os ramos secos da avoadinha-peluda interferem na colheita mecânica da cenoura, mesmo em densidades baixas (Vidal *et al.*, 2007).

O controlo químico da espécie é realizado através de herbicidas, destacando-se o glifosato que inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS). Este herbicida é muito utilizado em áreas com culturas resistentes ao glifosato e em culturas perenes (Vidal *et al.*, 2007).

O glifosato inibe a EPSPS, responsável pela reação de conversão do shiquimato-3-fosfato e do fosfoenolpiruvato em EPSP e fosfato inorgânico, na via do ácido shiquímico (Geiger e Fuchs, 2002). A inibição da EPSPS resulta na acumulação de ácido shiquímico nas plantas e na redução da biossíntese de aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e fenilalanina (Moreira *et al.*, 2010).

A resistência é a capacidade adquirida de uma planta ou de uma população vegetal sobreviver a determinados tratamentos herbicidas que, sob condições normais, controlam os indivíduos da população. O uso repetido de uma molécula herbicida pode selecionar populações resistentes de plantas infestantes pré-existentes na população, levando ao aumento da sua densidade (Powles e Holtum, 1994). Em geral, espécies ou populações de uma espécie que melhor se adaptam a uma determinada prática são selecionados e multiplicam-se rapidamente (Holt e LeBaron, 1990). Há estudos que sugerem que o aparecimento de resistência a um herbicida numa população de plantas se deve à seleção de genótipos resistentes pré-existentes, que, devido à pressão de seleção, exercida por repetidas aplicações de um mesmo herbicida, encontram condições para se multiplicar (Holt e LeBaron, 1990).

Quando uma população de plantas infestantes é selecionada numa determinada área, em que a densidade da população resistente é suficiente para limitar a produção das culturas agrícolas, há necessidade de mudanças nas práticas de gestão utilizadas (Moreira *et al.*, 2010). Assim, o estudo de alternativas de controlo é fundamental para uma adequada gestão das populações resistentes (López-Ovejero *et al.*, 2004; 2006).

Para Boerboom (1999), o aspeto mais importante na prevenção e gestão da resistência é a recomendação de práticas e sistemas de produção em que a pressão de seleção de populações resistentes a determinado herbicida seja reduzida.

Segundo Peterson (1999), a mudança mais comum, adotada pelos agricultores em áreas onde foram detetadas populações de plantas infestantes resistentes, é a aplicação de herbicidas alternativos (herbicidas com diferentes modos de ação) de forma isolada ou em mistura com outros herbicidas de diferentes modos de ação.

Também, Powles e Holtum (1994) comentam que a alternativa da mistura de herbicidas, bem como o uso de misturas formuladas ou aplicações sequenciais de herbicidas para gestão e prevenção da resistência, baseia-se no facto das substâncias ativas controlarem eficientemente as duas populações da mesma espécie, ou seja, a população resistente a um dos herbicidas é controlada pela outra substância ativa da mistura.

Peterson (1999) afirma também que a mudança do herbicida só se torna viável se existirem herbicidas alternativos que promovam o controlo das infestantes em níveis similares e a custos compatíveis com os do sistema de produção.

O primeiro caso de *C. bonariensis* resistente ao glifosato foi denunciado em 2003 na África do Sul (Weed Science, 2006). Foram identificadas populações resistentes ao glifosato em pomares de citrinos. O mesmo se verificou em áreas cultivadas com soja transgénica (Lamego e Vidal, 2007). A ocorrência de populações resistentes aos herbicidas indica a necessidade de técnicas de proteção integrada de plantas infestantes (Vidal *et al.*, 2007). Para realizar uma proteção integrada, é necessário conhecer a bioecologia dessa espécie (Vidal *et al.*, 2007). As condições ambientais como luminosidade, temperatura, solo e a interação entre ambos são os principais fatores ambientais que regulam a germinação e a emergência de plântulas (Frankland e Taylorson, 1983; Baskin e Baskin, 1998). Estudos realizados com uma espécie de *Conyza* spp. evidenciaram que a temperatura ótima para a germinação das sementes se situa entre 20 e 25 °C e que a presença de luz favorece a germinação das sementes (Nandula, 2006).

Devido à dificuldade em controlar esta espécie, especialmente através de métodos químicos, e devido ao aparecimento de populações resistentes aos herbicidas, as práticas de gestão da avoadinha-peluda requerem a combinação de múltiplas ações, como o aumento da intensidade de mobilização do solo, a rotação de culturas e a adoção de técnicas culturais apropriadas.

Este trabalho foi realizado no sentido de confirmar se uma população de *C. bonariensis* suspeita de resistência ao glifosato e proveniente de um pomar de citrinos em Ferreira do Alentejo era efetivamente resistente ao herbicida. Este foi o primeiro estudo desenvolvido para esta população e utilizou-se ainda uma população da mesma espécie conhecida como suscetível, que serviu de referência e era proveniente de um olival em Beja. Para o efeito foram efetuados: i) ensaios de dose-resposta ao glifosato em meio agar para averiguar o efeito do herbicida em diferentes parâmetros, nomeadamente, na capacidade germinativa, na emergência e na taxa de mortalidade, ii) com planta inteira no sentido de avaliar o efeito do herbicida na planta através de curvas de dose-resposta e iii) um ensaio para determinação do shiquimato para verificar, de forma indirecta, o mecanismo de resistência ao glifosato, através da acumulação celular de shiquimato na planta. Pretendeu-se ainda identificar herbicidas alternativos, nomeadamente o flazasulfurão, para o controlo de populações de *C. bonariensis*, através de ensaios de dose-resposta com planta inteira que permitam comparar o efeito deste herbicida na planta com o efeito do glifosato.

II. Revisão Bibliográfica

2.1. Resistência adquirida a herbicidas

2.1.1. Definição de resistência

Os termos “tolerância” e “resistência” são frequentemente usados de forma semelhante pela herbologia.

A *Weed Science Society of America* (WSSA) define tolerância ao herbicida como “a capacidade intrínseca da espécie vegetal para sobreviver e reproduzir-se após tratamento com herbicida”. Este fato implica que não houve seleção nem manipulação genética no sentido de tornar a planta tolerante, ou seja, é naturalmente tolerante (Nandula, 2010). A tolerância é a base da seletividade na utilização de herbicidas dado que certas infestantes são suscetíveis aos efeitos de um herbicida que a cultura pode facilmente suportar (Vencill *et al.*, 2012). A resistência ao herbicida foi definida pela WSSA como a capacidade intrínseca de algumas espécies em sobreviver e se reproduzir após o tratamento herbicida, mesmo sofrendo lesões. Numa planta a resistência pode ocorrer de forma natural ou ser induzida por técnicas como a engenharia genética ou a seleção de variedades produzidas através da cultura de tecidos ou mutagênese” (Nandula, 2010). Esta definição de resistência é consistente com uma definição anterior (Powles *et al.*, 1997) onde a resistência a herbicidas foi definida como a capacidade adquirida de uma planta em sobreviver a uma determinada dose de um herbicida que, em condições normais, controla os restantes indivíduos da população.

Existem outras definições de tolerância e de resistência a herbicidas na literatura (Nandula, 2010). O termo “tolerância” foi utilizado para descrever a base bioquímica e fisiológica da seletividade a herbicidas, que se traduz, na capacidade de determinadas espécies vegetais (sejam variedades cultivadas ou populações de infestantes) de suportarem a aplicação de certos herbicidas e, normalmente, só está um gene envolvido. Já na resistência, são vários os genes envolvidos e a resposta da planta só se verifica em doses muito elevadas do ponto de vista agronómico (Devine *et al.*, 1993).

A tolerância pode ser gradual e depende da atividade da enzima metabolizante. Por outras palavras, a tolerância descreve-se como aumentos subtis de insensibilidade ao herbicida (Nandula, 2010). Determinadas espécies de plantas infestantes são naturalmente tolerantes aos herbicidas devido às suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas (Ware 1994). Por outro lado, as populações resistentes surgem devido à seleção genética que ocorre durante um período de tempo que inclua vários ciclos de vida. As tolerâncias individuais podem ocorrer, no entanto, de forma natural (Nandula, 2010).

A resistência a herbicidas em infestantes é um problema global. Atualmente estão confirmadas 393 populações resistentes a herbicidas em todo o mundo, 211 espécies sendo 124 dicotiledóneas e 87 monocotiledóneas (Heap, 2010). Nos Estados Unidos estão identificadas 139 dessas populações, na Austrália 60, o no Canadá 52, na França e na Espanha 33, no Brasil 25, na Alemanha 26, em Israel

27, no Reino Unido há 24, e encontraram-se entre 1 a 19 populações na maioria dos outros países com agricultura intensiva. Em Portugal, conhecem-se casos de resistência ao glifosato em *C. bonariensis* e *C. canadensis* em olival e em *Lolium rigidum* e *L. perenne* em vinha (Calha, I. M. e Osuna, M. D., 2010; Mendes, S. *et al.*, 2011) Cada uma destas populações é resistente a pelo menos um modo de ação do herbicida e muitos modos de ação foram selecionados para um certo número de infestantes resistentes. Por exemplo, 116 populações são resistentes a herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS), e existem 21 populações resistentes ao glifosato, 13 delas nos Estados Unidos. O fenómeno de resistência aos herbicidas por parte das infestantes, no entanto, não começou com a introdução de culturas geneticamente modificadas resistentes aos herbicidas. Numerosos casos de infestantes resistentes têm evoluído em cultivares agrícolas convencionais em todo o mundo a partir da pressão de seleção colocada sobre elas devido à utilização repetida de herbicidas com o mesmo modo de ação ou ao fato de existirem, dentro da população, genes de resistência específicos. A resistência de uma planta não é devida ao herbicida causar uma alteração genética na planta que faz com que seja resistente. Em vez disso, algumas plantas com resistência natural ao herbicida sobrevivem a uma aplicação do herbicida, e enquanto essas plantas se continuam a reproduzir e cada geração é exposta ao herbicida, o número de plantas resistentes na população aumenta até que elas passem a dominar a população de plantas susceptíveis (Vencill *et al.*, 2012a).

2.1.2. Principais fatores de resistência adquirida a herbicidas

Os três fatores principais que influenciam a resistência são a pressão de seleção imposta pelo herbicida, a frequência inicial do gene resistente e a densidade da infestante (Christoffoleti, 2008).

De acordo com Christoffoleti *et al.* (2000) qualquer população em que os indivíduos evidenciem uma base genética variável quanto à tolerância a uma medida de controlo, irá através do tempo, mudar a sua densidade populacional como mecanismo de manutenção da sobrevivência, diminuindo a sensibilidade a esta medida de controlo.

As infestantes são organismos biológicos que evoluem em resposta às alterações ambientais, que causam modificações nas espécies e resistência das infestantes aos herbicidas. O uso excessivo de herbicidas na agricultura é uma das maiores causas da pressão de seleção, proporcionando a ocorrência do fenómeno de resistência das infestantes aos herbicidas, devido à eficácia e ao controlo seletivo. A evolução da [resistência de infestantes aos herbicidas](#) é consequência de fatores seletivos, que resultam na seleção intra-específica de populações (resistência a herbicidas) e na seleção inter-específica (tolerância a herbicidas). Dentro destes fatores, inclui-se a escolha do herbicida, o sistema de cultivo, a escolha da cultura, as práticas culturais, as alterações climáticas e a introdução de novas espécies (Christoffoleti, 2008).

Todas as populações de infestantes, independentemente da aplicação de qualquer produto, provavelmente contêm plantas individuais que são resistentes a herbicidas (Kissmann, 2003). A

resistência a herbicidas numa população de infestantes pode ocorrer através de dois mecanismos, que são a mutação ou a alteração de genes existentes na população de infestantes que conferem resistência à população (seleção natural) (Christoffoleti, 2008).

A resistência pode acontecer pela ocorrência de mutações genéticas, sendo que esta confere resistência ao herbicida. As mutações ocorrem ao acaso e são pouco frequentes. Essa mutação pode ter ocorrido antes ou após a aplicação do herbicida e não existem evidências que a mesma seja induzida pelos herbicidas. A seleção natural é o mecanismo que se pensa ter maior influência no desenvolvimento da resistência. Populações resistentes a herbicidas estão presentes em baixa frequência numa espécie de infestante. Quando o herbicida é aplicado, o mesmo atua como agente de pressão de seleção, as plantas suscetíveis morrem e as plantas resistentes sobrevivem e continuam a reproduzir-se sem a competição das plantas suscetíveis (Christoffoleti, 2008).

A população resistente não infesta totalmente a área no primeiro ano. O surgimento da resistência aos herbicidas é identificado, normalmente, quando 30% das plantas mostram resistência. Geralmente, a resistência manifesta-se em manchas, e aumenta a sua proporção com a aplicação repetida do herbicida com o mesmo modo de ação, acabando, por fim, por dominar a área (Christoffoleti, 2008).

A combinação de fatores como o aumento significativo na utilização do glifosato, o aumento na adoção de sistemas conservacionistas de solo e possibilidade de utilização do glifosato em qualquer estágio fenológico das culturas criou um aumento significativo do risco de aparecimento de infestantes resistentes, devido ao aumento da pressão de seleção exercida pelo herbicida (Neve *et al.*, 2003).

A evolução da resistência de infestantes ao glifosato é recente, pois ao observar os registros da década passada, não se encontra nenhum caso de resistência, mesmo após 20 anos de utilização do glifosato (Dyer, 1994).

O fato de o glifosato ter sido comercializado por 20 anos sem que houvesse qualquer registro de resistência, fez com que alguns autores acreditassem que a resistência ao glifosato fosse improvável (Bradshaw *et al.*, 1997; Bracamonte *et al.*, 2001).

Os principais fatores que afetam a evolução da resistência das infestantes aos herbicidas têm sido agrupados em genéticos, bioecológicos e agronômicos. Os genéticos são inerentes aos indivíduos de uma mesma população de infestantes. Os fatores bioecológicos resultam da interação entre as características dos indivíduos e a ação do ecossistema sobre essa população, e os agronômicos são resultantes da seleção proporcionada pelas práticas agrícolas (Christoffoleti, 2008). De um modo geral, a velocidade e o número de anos para que a resistência das infestantes se desenvolva está relacionada com esses fatores (Matiello *et al.*, 1999). Destes fatores, os genéticos e os bioecológicos são de difícil manipulação para a gestão da resistência, porém de grande importância na avaliação do

potencial de risco da resistência. Deste modo, apenas os fatores agronômicos podem ser mais facilmente manipulados pelo homem na implementação de estratégias de manipulação da resistência (Christoffoleti, 2008).

Fatores genéticos

Entre os fatores genéticos que interagem no desenvolvimento da resistência, um dos mais importantes é a frequência inicial do genoma resistente a herbicidas. Para alguns grupos de herbicidas essa frequência é conhecida (Christoffoleti, 2008). No caso do glifosato, há alguns mecanismos, já conhecidos, responsáveis pela aquisição de resistência, por exemplo, em situações de elevada pressão de seleção, a alteração do mecanismo de um único gene, pode conferir resistência à planta, mesmo no caso de se estar a aplicar a dose de herbicida recomendada; em situações de baixa pressão de seleção, os genes que conferem um baixo nível de resistência podem amplificar, aumentando o nível de resistência ao longo do tempo (Gressel, 2002). Quanto maior a frequência inicial da população resistente, maior a probabilidade de aumentar a proporção de indivíduos resistentes na população, em menor período de tempo, com aplicações sucessivas do herbicida selecionador (Vidal e Fleck, 1997).

Outro fator é a dominância do gene envolvido na resistência. A resistência aos herbicidas para a maioria dos modos de ação é determinada por genes dominantes ou semi-dominantes, localizados no DNA do núcleo da célula. Através dessa herança nuclear os genes de resistência podem ser transmitidos pelos grãos de pólen para outra população suscetível da mesma espécie e, pela recombinação sexual, os descendentes podem tornar-se populações resistentes a determinado mecanismo de ação de um herbicida. Se a herança for de origem citoplasmática ou maternal, localizada em organelos como o mitocôndrias, o complexo de Golgi ou o cloroplasto, a transmissão acontecerá apenas naquela geração (Matiello *et al.*, 1999). Deste modo, a população com alelo de resistência dominante deixará como descendentes indivíduos resistentes, independentemente do tipo de fecundação da espécie (Christoffoleti, 2008).

Populações resistentes que se reproduzem, principalmente, pela autofecundação, apresentam velocidade de dispersão muito baixa, quando comparado a populações que apresentam fecundação cruzada (alogâmicas) devido à dificuldade do fluxo de genes entre plantas vizinhas. No entanto, na maioria das espécies a resistência é transmitida pelo pólen (como por exemplo, os inibidores da ALS), podendo atingir muitas plantas, e assim ser dispersada mais depressa (Vidal e Fleck, 1997a). Nas espécies alogâmicas existe maior probabilidade de ocorrência de múltiplos mecanismos de resistência, pois a polinização cruzada permite maior recombinação gênica (Christoffoleti, 2008).

No Brasil, Vargas *et al.* (2001), determinaram que a resistência a inibidores da ALS em *Euphorbia heterophylla* L. é codificada por um gene dominante nuclear com dominância completa. Quando a

resistência depende de um único gene, a possibilidade de desenvolvimento é maior e mais rápida que a dependente de mais de um gene (Christoffoleti, 2008).

Fatores bioecológicos

Outra característica das infestantes que é determinante no desenvolvimento da resistência é a adaptação ecológica (Christoffoleti, 2008). Segundo Christoffoleti (1997), entende-se por adaptabilidade ecológica a capacidade que uma população possui, dentro de uma população de infestantes, de manter ou aumentar a sua proporção ao longo do tempo. Assim, populações mais adaptadas são normalmente mais competitivas e capazes de aumentar a sua dimensão ao longo do tempo, eliminando os indivíduos menos adaptados ou menos competitivos.

A maior parte dos estudos que comparam a adaptabilidade ecológica de populações resistentes com a de suscetíveis, de uma mesma espécie, é conduzida em condições controladas e a adaptabilidade é avaliada indirectamente pela taxa de crescimento e pela produção de biomassa (Christoffoleti, 2008). Depois, as conclusões obtidas destes trabalhos feitos em estufa ou em câmara de crescimento são extrapoladas para a adaptabilidade em condições de campo (Holt e LeBaron, 1990).

Há estudos que têm mostrado que os parâmetros do potencial fotossintético de algumas infestantes resistentes aos herbicidas inibidores da fotossíntese são similares àqueles encontrados em populações suscetíveis (Schonfeld *et al.*, 1987).

Segundo Christoffoleti (1997) existem evidências que as populações de infestantes resistentes aos herbicidas inibidores da enzima ALS não são necessariamente menos produtivos que as populações suscetíveis da mesma espécie. Christoffoleti (1992) desenvolveu pesquisa em condições de estufa e de campo, em que não foram observadas diferenças na adaptabilidade ecológica de populações resistentes e suscetíveis da infestante aos herbicidas inibidores da ALS, devido ao fator de a mutação responsável pela resistência destes populações de infestantes não resultar num custo genético para a população resistente.

Há estudos que sugerem que a frequência de infestantes resistentes na população pode ser elevada antes que a pressão de seleção pelo herbicida ocorra. Uma possível diminuição na taxa de crescimento da planta resistente tem consequências diretas na competitividade da população e na sua dinâmica dentro da população, afetando diretamente as estratégias de gestão da resistência. A mesma adaptabilidade ecológica da população resistente e suscetível indica que ocupam nichos semelhantes no ambiente (Christoffoleti, 2008).

Os fatores bioecológicos determinantes no aparecimento de populações de infestantes resistentes aos herbicidas estão relacionados com as características da infestante. Desta forma, não existe qualquer indicação de quais são as espécies, géneros ou famílias botânicas de infestantes resistentes aos herbicidas. As características bioecológicas das infestantes que conduzem a um

rápido desenvolvimento da resistência são, o ciclo de vida curto, elevada produção de sementes, baixa dormência da semente, várias gerações reprodutivas por ano, extrema suscetibilidade a um determinado herbicida e grande diversidade genética (Christoffoleti *et al.*, 1994; Vidal e Fleck, 1997b; Vargas, 2003).

Algumas das características que não favorecem o desenvolvimento da resistência são, infestantes de ciclo de vida longo, pressão de seleção incompleta pelos herbicidas, baixa adaptabilidade ecológica das populações resistentes, dormência prolongada das sementes no solo e infestantes perenes com tecidos de reprodução vegetativa. Os fatores envolvidos no lento desenvolvimento da resistência aumentam o número de populações suscetíveis na população (Christoffoleti, 2008).

O banco de sementes pode retardar o aparecimento de populações de infestantes resistentes a um determinado herbicida. Quanto maior for o período de dormência das sementes das infestantes maior será o tempo necessário para esgotar o banco de sementes da população suscetível no solo, mesmo que haja pressão de seleção muito elevada (Christoffoleti, 2008). Portanto, a manutenção e a gestão de um banco de sementes diversificado no solo podem retardar o aparecimento de populações de plantas resistentes a um determinado herbicida, mantendo-se baixa a frequência dessa população, por um tempo maior (Christoffoleti *et al.*, 2000).

Quanto menor o período de dormência das sementes de uma espécie de infestante mais rapidamente poderá ocorrer a mudança de populações dentro da população (Christoffoleti, 2008). Quando um herbicida controla a população suscetível, e este deixa poucos descendentes no banco de sementes para a geração seguinte, estas apresentam uma rápida senescência, substituindo rapidamente o banco de sementes da população suscetível pela população resistente (Christoffoleti, 1997).

O número ou densidade das infestantes é muito importante porque, como se considera que plantas resistentes ocorrem naturalmente em populações de infestantes, quanto maior a densidade dessas plantas maior a probabilidade de que alguns indivíduos resistentes estejam presentes (Kissmann, 2003).

Fatores agronômicos

Os fatores agronômicos que favorecem o rápido desenvolvimento da resistência estão relacionados com as características do herbicida e as práticas culturais. No caso dos herbicidas, alguns grupos químicos apresentam maiores riscos de desenvolvimento de resistência quando comparados com outros, principalmente aqueles que apresentam um único mecanismo de ação (Christoffoleti, 2008). A utilização de herbicidas residuais ou herbicidas sem ação residual, mas aplicados repetidamente, o uso de herbicidas com elevado grau de eficácia no controle da população suscetível e as aplicações de doses elevadas proporcionam uma pressão de seleção muito grande, favorecendo o

desenvolvimento da população resistente (Christoffoleti *et al.*, 1994; Vidal e Fleck, 1997b; Vargas, 2003).

Nas regiões onde as condições ambientais não são favoráveis à decomposição do herbicida, a maior persistência do produto no solo favorecerá o processo de seleção de populações de infestantes resistentes, sendo maior a pressão de seleção exercida sobre a população de infestantes, principalmente se houver múltiplos fluxos de emergência de sementes no mesmo ano agrícola (Gazziero *et al.*, 1998).

As sementes de infestantes apresentam um padrão de germinação que pode ser classificado em contínuo ou em fluxos (Egley e Willians, 1991). Se utilizarmos um herbicida com elevada persistência, a germinação ou a emergência desses fluxos será controlada pelo produto, ocorrendo assim, uma pressão de seleção muito grande para a população resistente, já que seria impedida a produção de sementes de infestantes da população suscetível (Christoffoleti, 2008). O ideal seria que o herbicida tivesse efeito apenas no período crítico de competição entre a cultura e as infestantes e que os fluxos fossem controlados apenas pelo ensombramento da cultura (Christoffoleti *et al.*, 2000).

O uso de herbicidas de ação foliar sem atividade residual (como por exemplo o glifosato) também impõe uma elevada pressão de seleção se as aplicações forem feitas repetidamente sempre que as infestantes emergirem (Christoffoleti *et al.*, 1994).

Quando o herbicida é aplicado nas doses recomendadas ocorre o controle apenas da população suscetível, sendo que a população resistente consegue sobreviver, escapando à ação do herbicida e produzindo sementes (Christoffoleti, 2008). Se o herbicida é altamente eficaz no controle da planta suscetível, ou seja, controla 100% das plantas suscetíveis, apenas a população resistente é que consegue produzir sementes e desta forma o banco de sementes da população resistente tende a aumentar e a população suscetível tende a diminuir, principalmente se o banco de sementes desta população for de curta duração (Christoffoleti, 1997).

Torna-se evidente que doses elevadas de herbicidas proporcionam uma pressão de seleção muito elevada sobre a população resistente da infestante. Assim, áreas que recebem doses elevadas de herbicidas têm maior tendência a desenvolver populações de infestantes resistentes aos herbicidas (Christoffoleti, 1997, 2008). Recomenda-se, por isso, que se aplique sempre a dose recomendada no rótulo e não doses superiores ou inferiores.

Entre as práticas culturais que podem levar ao aparecimento de populações resistentes há (Christoffoleti *et al.*, 1994; Vidal e Fleck, 1997b; Gazziero *et al.*, 1998; Vargas, 2003):

- a gestão de infestantes exclusivamente através de herbicidas,

- o uso repetitivo do mesmo herbicida ou de herbicidas com o mesmo modo de ação durante vários anos,
- falta de rotação de culturas (monocultura) e de herbicidas,
- pouca utilização de controlo mecânico de infestantes,
- a não eliminação daquelas que escapam ao controlo do herbicida,
- a não utilização de mistura de herbicidas no controlo de infestantes numa cultura.

Se o mesmo herbicida é usado na gestão de infestantes durante vários anos, a ocorrência de uma população resistente tem maior probabilidade de acontecer. Em sistemas de monocultura de áreas extensivas é comum o uso de apenas um único herbicida nos diversos ciclos culturais (Christoffoleti, 2008). A aplicação sequencial de dois herbicidas diferentes, porém com o mesmo modo de ação, tem um efeito semelhante à aplicação repetitiva de um dos herbicidas isoladamente, pois ambos exercem pressão de seleção semelhante na população (Christoffoleti *et al.*, 2000).

Entre as características relacionadas ao sistema de cultura, a sementeira direta e a mobilização mínima é amplamente utilizada por razões de conservação do solo e da água, porém favorecem o aparecimento de alguns tipos de infestantes anuais e perenes – inversão florística. Isso acontece, porque o desenvolvimento de populações de infestantes é facilitado a partir de sementes produzidas na cultura anterior, que são mantidas à superfície do solo (Christoffoleti, 2008). Este processo acelera o desenvolvimento de infestantes resistentes porque o banco de sementes é menor (Madsen e Jensen, 1998). A maior emergência de infestantes justifica a utilização de herbicidas de pós-emergência, o que aumenta a pressão de seleção, sendo que no sistema convencional é menor devido à menor utilização de herbicidas (Boerboom, 1999).

Mortimer e Hill (1999) demonstraram que diferentes sistemas de gestão conduzem a diferentes infestações de infestantes. Comparando sistemas de sementeira direta, mobilização mínima e convencional, os autores observaram uma grande diferença entre as espécies dominantes no final do estudo, onde a composição da população inicial era a mesma. Na sementeira direta, logo nos primeiros anos, houve um grande aumento de infestantes de folha larga, mostrando a adaptação destas infestantes ao sistema. Esta adaptação também é observada em função do herbicida usado na área (Christoffoleti, 2008).

2.1.3. Estratégias de controlo ou prevenção de resistência adquirida

Para López-Ovejero *et al.* (2004), os princípios básicos que devem suportar a escolha de técnicas que visem a prevenção de resistência adquirida e controlo de infestantes resistentes são:

- i) A gestão do banco de sementes de infestantes - a potencial densidade populacional de infestantes numa área é determinada pelo número de sementes ou propágulos viáveis no solo (banco de sementes), as quais podem permanecer vivas e/ou dormentes nos solos agrícolas por vários anos. Um método de a reduzir é evitar a adição de novos propágulos, através do controlo de produção de

sementes de infestantes (ex. populações resistentes). Quando não se permite a produção de sementes por meio das diferentes técnicas de gestão, observa-se um rápido declínio populacional das infestantes, reduzindo a densidade de infestação e permitindo maior eficácia no seu controle. Para Beckie (2006), minimizar a produção de sementes é fundamental em programas de gestão de infestantes suscetíveis e resistentes a herbicidas. No entanto, é conhecido entre os agricultores que um ano de controle ineficiente de infestantes numa cultura é suficiente para restabelecer o banco de sementes original, mesmo depois de vários anos de controle eficaz num programa de redução do banco de sementes (Christoffoleti e Mendonça, 2001). No caso específico das populações resistentes, o banco de sementes nos primeiros anos após a detecção da resistência é muito grande, o que dificulta a sua gestão mesmo com estratégias alternativas (Christoffoleti, 2008). Para Peterson (1999), o maior custo direto da resistência para o produtor ocorre no primeiro ano em que a resistência é detetada, devido ao reduzido controle e consequente perda de produtividade. A população resistente uma vez estabelecida no banco de sementes pode permanecer por um longo período de tempo e, às vezes, indefinidamente.

- ii) Diminuir a pressão de seleção dos herbicidas: O aspeto mais importante é a recomendação de técnicas e sistemas de produção em que a pressão de seleção dos herbicidas seja reduzida (Boerboom, 1999). Assim, a prevenção ou controle da resistência de infestantes a herbicidas no sistema de produção exige o conhecimento detalhado da classificação quanto ao modo e mecanismo de ação, espectro de controle, eficácia e propriedades físico-químicas dos herbicidas, além das diferentes opções de uso no planeamento das culturas (Christoffoleti, 2008).
- iii) Adaptabilidade ecológica dos populações resistentes: Uma possível diminuição na adaptabilidade ecológica da população resistente tem consequências diretas na competitividade do mesmo e, portanto, na sua dinâmica dentro da população. Deste modo, quando o fator de pressão de seleção é eliminado (herbicida) a frequência genética da população resistente diminui rapidamente no banco de sementes devido a sua menor adaptabilidade, facilitando a sua gestão. No entanto, quando a população resistente e suscetível apresentam a mesma adaptabilidade ecológica, significa que ocupam nichos semelhantes no ambiente (Christoffoleti, 2008). Dessa forma, as estratégias de controle e de prevenção devem ser adoptadas antes do surgimento de populações resistentes, porque uma vez estabelecida uma população resistente, não há um retorno natural para uma frequência original de suscetibilidade (Christoffoleti e Mendonça, 2001).
- iv) Resistência cruzada negativa: Trata-se de uma resistência onde, o mecanismo bioquímico ou morfológico presente confere a uma determinada população resistência a um herbicida ou ao grupo químico cujo modo de ação é igual e, consequentemente, provoca nesta população maior suscetibilidade a outros herbicidas de diferente modo de ação (Christoffoleti, 2008). Esta forma de resistência foi observada por Gadamski *et al.* (2000) ao estudar uma população de *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. Resistente a herbicidas da família química das triazinas que é mais sensível aos inibidores da acetolactato sintase (ACCCase) do que a população suscetível.

As estratégias de prevenção de resistência não-químicas para a prevenção de resistência (rotação de culturas, medidas culturais e mecânicas), provocam a mortalidade de ambas as populações de infestantes (suscetível e resistente), assim a pressão de seleção mantém-se, a menos que existam diferenças de adaptabilidade ecológica entre as populações (Boerboom, 1999). As estratégias químicas (herbicidas) podem ser utilizadas para reduzir a pressão de seleção, através do planeamento criterioso da utilização dos herbicidas de diferentes modos de ação, diminuindo os riscos de resistência e mantendo a diversidade de populações no banco de sementes do solo. Desta forma, o aspeto mais importante é a recomendação de técnicas em que a pressão de seleção de populações resistentes a determinado herbicida seja reduzida (Christoffoleti, 2008). Para isso, é necessário ir alterando as técnicas normalmente utilizadas, utilizando as mesmas em conjunto (químicas e não-químicas), visando evitar ou retardar o aparecimento de populações de infestantes resistentes (Gressel e Segel, 1990).

Os principais métodos de proteção são os seguintes:

Métodos não químicos

- Rotação de culturas - A rotação de culturas permite ao produtor utilizar práticas químicas e não-químicas. A “rotação de culturas” é a alternância ordenada de espécies vegetais ao longo de diferentes anos em determinada área, com finalidades pré-definidas, observando-se um período sem a utilização da mesma cultura na mesma área. A rotação de culturas reduz o sucesso na instalação de infestantes, por estarem adaptadas à cultura anterior. A rotação de culturas pode ser utilizada para reduzir a utilização de herbicida ou do mesmo herbicida ao longo dos anos. Algumas das práticas que podem ser implementadas são: i) instalação de diferentes culturas; ii) instalação de diferentes culturas que permitam a utilização de herbicidas com diferentes modos de ação; iii) instalação de diferentes culturas que permitam a utilização de técnicas alternativas de controlo (diferentes do químico) (Christoffoleti, 2008).

- Métodos Culturais - Medidas e procedimentos com o objetivo da prevenção de infestações e disseminação de infestantes (populações resistentes), bem como o fortalecimento da capacidade competitiva da cultura, representadas pelo seu rápido estabelecimento e desenvolvimento. O conhecimento da capacidade de competição das espécies utilizadas na agricultura ou a alteração do seu espaço podem aumentar a capacidade competitiva das culturas, o que poderia causar uma menor necessidade de utilização de herbicidas. Existem três períodos de interferência, sendo o primeiro destes designado PAI – período anterior à interferência; outro período extremo é designado de PTPI – período total de prevenção da interferência; o intervalo existente entre o PAI e o PTPI recebe a denominação de PCPI – período crítico de prevenção da interferência, onde, a cultura deve ser conduzida sem a presença de infestantes para assegurar rendimentos aceitáveis. Assim, o período de atividade dos herbicidas deve ser até ao fim do PTPI para evitar maior pressão de seleção sobre a população de infestantes. O conhecimento dos conceitos de períodos de interferência facilita

o processo de tomada de decisão sobre as técnicas de gestão de infestantes a adotar. A interferência das infestantes será tanto maior quanto mais longo for o período de convivência com a cultura e a interferência será mais significativa quanto mais precoce for a germinação da comunidade infestante quando comparada com a germinação das plantas cultivadas (Christoffoleti, 2008). Para além destes métodos, existem outros, nomeadamente, a data de sementeira, a falsa sementeira, a densidade de sementeira ou variedades mais competitivas.

- Método mecânico – A introdução deste método na instalação da cultura pode substituir a gestão através de químicos ou pode ser utilizado em conjunto com os herbicidas, realizando a mobilização nas entrelinhas e a aplicação de herbicidas apenas na linha de cultura, reduzindo a utilização do mesmo e diminuindo a pressão de seleção. A mobilização do solo também reduz a pressão de seleção devido ao enterrar das sementes de infestantes (Christoffoleti, 2008). Nalgumas situações não é recomendável fazer uma mobilização anual mas mobilizar o solo uma vez a cada quatro a cinco anos pode ser uma alternativa viável, porque muda a flora de infestantes através de uma maior diversificação de espécies (Cussan e Moss, 1982). Outra técnica muito importante é a limpeza das máquinas antes de se deslocar de uma área para outra, evitando dessa forma a dispersão da infestação (Christoffoleti, 2008). Para além destes métodos, existem outros, como o corte, o pastoreio, cobertura do solo (por espécies vegetais ou por detritos vegetais).

Métodos químicos

A escolha dos herbicidas é fundamental para diminuir a pressão de seleção dos mesmos sobre a população de infestantes (Beckie, 2006). As principais recomendações na gestão de herbicidas são:

- i) Utilizar o herbicida conforme a recomendação do fabricante, observando todas as recomendações técnicas e ter em conta que herbicidas que apresentam elevada eficácia, apresentam maior risco de desenvolvimento de resistência;
- ii) Ter em conta a época, dose e o número de aplicações de aplicação, de modo a reduzir o uso desnecessário de herbicidas;
- iii) Acompanhar os resultados das aplicações dos herbicidas, deixando pequenas áreas testemunhas sem aplicação, a fim de detetar quaisquer tendências ou mudanças na densidade populacional das infestantes presentes;
- iv) Aplicar herbicidas somente quando necessário, para evitar atingir o limiar crítico de infestação que possa causar danos significativos à cultura;
- v) Utilizar herbicidas de baixa atividade residual no solo, porque a persistência dos herbicidas está relacionada com as propriedades físico-químicas do mesmo e com as características edafo-climáticas da região onde é aplicado e é uma característica que pode elevar a pressão de seleção de populações resistentes;

vi) Diminuir a frequência de aplicação de herbicidas com modo de ação específico, principalmente em áreas com elevada densidade populacional de infestantes, visto que apresentam elevado risco de desenvolvimento de resistência;

vii) Evitar a utilização de herbicidas com o mesmo modo de ação para o qual a resistência foi confirmada, a menos que em mistura com outros herbicidas de diferentes modos de ação, cujo espectro de controlo das infestantes inclua a espécie da população resistente (Christoffoleti, 2008);

A técnica da mistura de herbicidas com diferentes modos de ação na prevenção e controlo da resistência pode ser mais eficaz do que a rotação de herbicidas (Powles *et al.*, 1997). No entanto, a estratégia de rotação ou mistura de herbicidas é muitas vezes impraticável, já que os herbicidas alternativos não apresentam os mesmos custos e eficácia de controlo da infestante resistente quando comparados aos normalmente recomendados (Peterson, 1999). Podem ser diferentes na sua tolerância por parte da cultura e espectro de ação nas infestantes, no entanto, cada herbicida apresenta propriedades físico-químicas e momento de aplicação particulares. Para além disso, algumas misturas recomendadas, podem mostrar incompatibilidade físico-química dentro do depósito (Olsen *et al.*, 1996) ou na rotação de culturas (Bourgeois *et al.*, 1997).

Um problema que pode complicar a recomendação do herbicida é o momento em que a resistência é detetada. As práticas de gestão para campos onde o problema é verificado durante o ciclo cultural são muito mais complexas que aquelas onde o problema foi detetado na cultura anterior. No decorrer de um ciclo cultural, dependendo do sistema de produção utilizado, há diferentes momentos possíveis de realizar o controlo de infestantes com herbicidas que apresentam diferentes modos de ação. Para cada cultura as possibilidades são diferentes dependendo da gestão agronómica mais indicada e dos produtos registados para a mesma (Christoffoleti, 2008).

Ainda de acordo com Christoffoleti (2008), a época de intervenção mais adequada pode ser:

- Gestão de infestantes em situações de seca: A utilização de herbicidas residuais pode proporcionar alguns benefícios além da gestão da resistência: i) vantagem competitiva das plantas da cultura em relação aos primeiros fluxos de emergência de infestantes; ii) redução na necessidade de aplicação de herbicidas pós-emergentes seletivos após a implantação da cultura; iii) garantia de produção sem interferência das infestantes ou infestações tardias; iv) seletividade para a cultura em relação aos herbicidas residuais;

- Gestão de infestantes durante o período crítico de competição: São utilizados herbicidas seletivos em pré e/ou pós-emergência ou não-seletivos com aplicação localizada que apresentem modos de ação diferentes. Esta prática evita a interferência tanto de infestantes resistentes quanto de suscetíveis;

- Gestão de infestantes na pré-colheita das culturas: utilizar o herbicida de forma a reduzir a produção de sementes de infestantes e evitar a dispersão de possíveis infestantes resistentes, além da uniformização da maturação e antecipação da colheita;

- Gestão de infestantes na pós-colheita das culturas: A gestão do banco de sementes de infestantes suscetíveis e resistentes nesta altura pode ser uma estratégia importante para diminuir os efeitos competitivos na safra. A utilização de herbicidas não seletivos como o glifosato podem ser ferramentas importantes, porque não afetam a rotação de culturas;
- Gestão de infestantes com culturas geneticamente modificadas: As culturas tolerantes aos herbicidas possibilitam a adoção de modos de ação diferentes daqueles usados em cultivares convencionais para a gestão da população resistente.

Para Beckie (2006), a adoção de culturas geneticamente modificadas tolerantes a herbicidas permite a gestão de infestantes resistentes a herbicidas de alto risco. No entanto, a utilização frequente deste tipo de cultura no sistema de produção pode resultar na aplicação frequente do mesmo herbicida, com o mesmo modo de ação, selecionando populações resistentes ou tolerantes ao mesmo.

2.2. Glifosato

2.2.1. Modo de ação e comportamento na planta

O glifosato (N-fosfonometil glicina), foi originalmente sintetizado em 1964 como potencial agente quelante industrial e o seu uso como herbicida foi descrito em 1971. Em condições ambientais, tanto o glifosato como os seus sais são sólidos cristalinos, muito solúveis em água (12 g/L a 25 °C) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns (Yamada e Castro, 2007).

O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas. É um herbicida não-selectivo e sistémico de largo espectro de ação o que permite um excelente controlo de infestantes anuais ou perenes, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Galli e Montezuma, 2005).

As aplicações do produto devem sempre ser dirigidas sobre as infestantes seguindo as recomendações técnicas e boas práticas agrícolas para evitar qualquer interferência no metabolismo, desenvolvimento ou produtividade das culturas para as quais é recomendado (Galli e Montezuma, 2005). Deste modo, se o produto for aplicado de forma inadequada, ao entrar em contacto com a cultura, expressará sua actividade herbicida e poderá causar danos à mesma de acordo com a sua suscetibilidade e dose aplicada (Galli e Montezuma, 2005).

Os sintomas mais comuns observados após a aplicação de glifosato são clorose foliar seguida de necrose. Outros sintomas foliares são: enrugamento ou malformações e necrose meristemático. Comparando com alguns herbicidas de contacto, os danos causados pelo glifosato geralmente desenvolvem-se lentamente, com a morte da planta a ocorrer após vários dias ou mesmo semanas. Devido ao longo tempo que requer, a estabilidade *in vivo* do glifosato é uma importante característica que contribui para seus efeitos fitotóxicos irreversíveis (Yamada e Castro, 2007). Nas plantas, o

glifosato é muito estável, com baixa degradação detetável, é muito pouco metabolizado nas plantas e ocorrendo num longo período de tempo (Duke, 2011; Gruys e Sikorski, 1999).

O glifosato é absorvido pelas folhas e tecidos verdes da planta e translocado preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos (Galli e Montezuma, 2005).

A rápida translocação do glifosato das folhas da planta tratada para as raízes, rizomas e meristemas apicais é uma das mais importantes características do glifosato (Yamada e Castro, 2007). Esta propriedade sistêmica permite a destruição dos órgãos subterrâneos de infestantes perenes (Sprankle *et al.*, 1975a; Franz, 1985; Gruys e Sikorski, 1999).

Quando o glifosato é aplicado sobre as plantas, ocorre inicialmente uma rápida penetração na mesma, seguida por uma longa fase de lenta penetração, sendo que a duração dessas fases depende de diversos fatores, incluindo a espécie, idade, condições ambientais e concentração do glifosato e do adjuvante. O glifosato é móvel no floema (simplasto) e é rapidamente translocado por todas as partes da planta mas tende a acumular-se nas regiões meristemáticas. Estudos sugeriram que as cargas negativas da parede celular repelem o glifosato, fortemente aniônico. Essa falta de uma forte ligação pode contribuir para o movimento do glifosato no apoplasto, ou seja, ele apresenta movimentação tanto simplástica como apoplástica. O herbicida pode penetrar na planta por outras vias (Yamada e Castro, 2007). Turner e Loader (1974) demonstraram que emulsões permitiram ao glifosato penetrar pela casca de espécies arbóreas. Raízes de cultivares em solução nutritiva contendo glifosato absorvem o herbicida que se transloca através da planta (Haderlie *et al.*, 1978; Gruys e Sikorski, 1999).

Como o glifosato se movimenta através do simplasto, as aplicações do produto em folhas mais velhas permitem a translocação do herbicida para as regiões de crescimento no resto da planta, juntamente com os fotoassimilados (Peterson *et al.*, 1978).

Modo de ação primário

O glifosato atua como inibidor da atividade da enzima 5- enolpiruvilshiquimato-3 fosfato sintase (EPSPS), que catalisa a condensação do ácido shiquímico e do ácido pirúvico, evitando a síntese de três aminoácidos aromáticos - fenilalanina, tirosina e triptofano – parando o crescimento da planta (Galli e Montezuma, 2005). Influencia também outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do IAA (Cole, 1985; Rodrigues, 1994).

Após a aplicação de glifosato verifica-se um aumento acentuado na concentração de shiquimato, precursor comum na via metabólica desses três aminoácidos. O local de ação é a enzima EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase). O glifosato inibe a EPSPS por competição com o substrato PEP (fosfoenolpiruvato).

A EPSPS catalisa uma reação de transferência, pouco comum, da porção carboxivinil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o 5-OH do shiquimato 3-fosfato (S3P), num complexo ternário (EPSPS•S3P•PEP), formando EPSP e fosfato inorgânico (Pi) (Sammons *et al.*, 1995; Sikorski *et al.*, 1997).

Esta reação é reversível, e a atividade enzimática pode ser efetuada nas duas direções. Vários estudos demonstram que na presença de glifosato forma-se preferencialmente um complexo ternário com a enzima S3P (EPSPS•S3P•glifosato). Este complexo representa a ligação enzimática ao glifosato que é responsável pela sua atividade herbicida na planta. Outra hipótese de modelo apresentada em estudos anteriores demonstra que um outro complexo ternário (EPSPS•EPSP•glifosato) pode formar-se (Sammons *et al.*, 1995; Sikorski *et al.*, 1997).

A enzima EPSPS é sintetizada no citoplasma e transportada para o cloroplasto onde vai actuar; o glifosato liga-se à enzima através da glutamina (Ferreira, *et al.*).

O ponto final da via do shiquimato é a formação do corismato, a partir do qual muitos metabolitos secundários são formados. Entre eles cita-se o tetrahidrofolato (THF), ubiquinona e vitamina K, que são essenciais à sobrevivência da planta. A fenilalanina, além de participar na biossíntese de proteínas, é também substrato para a via do fenilpropanóide que produz numerosos produtos secundários de plantas, tais como antocianinas, lenhina, promotores e inibidores de crescimento, bem como compostos fenólicos (Yamada e Castro, 2007). O triptofano é precursor do ácido indolacético (IAA), necessário para a expansão celular, manutenção da dominância apical entre outros processos reguladores (Devine *et al.*, 1993; Gruys e Sikorski, 1999).

A simples redução de aminoácidos e a acumulação de shiquimato não explicam a ação final do herbicida; pensa-se que a desregulação da via do ácido shiquímico causa a perda de carbonos

disponíveis para outras reações celulares na planta, uma vez que 20% do carbono das plantas é utilizado nesta via metabólica, pois os aminoácidos fenilalanina (FEN), triptofano (TRP) e tirosina (TRY) são precursores da maioria dos compostos aromáticos nas plantas. O glifosato reduz a síntese de fitoalexinas. Ocorre aumento da concentração em níveis tóxicos de azoto, etileno, ácido cianâmico entre outros compostos que aceleram a morte da planta (Ferreira, *et al.*; Sikorski *et al.*, 1997).

As bactérias que produzem quantidades excessivas de EPSPS podem desenvolver-se na presença de concentrações de glifosato que seriam tóxicas para outros organismos (Yamada e Castro, 2007). Deste modo, a transferência do gene com tolerância ao glifosato a uma planta suscetível confere a esta, assim geneticamente modificada, a tolerância ao glifosato (Gruys e Sikorski, 1999).

A interrupção da biossíntese dos aminoácidos aromáticos das plantas é uma estratégia atrativa para o desenvolvimento de herbicidas com características ambientais favoráveis. Isto porque, apesar da via do shiquimato estar presente em plantas e em muitos microrganismos (Padgett *et al.*, 1995), é completamente ausente em mamíferos, peixes, pássaros, répteis e insetos. Estas formas de vida não dependem da via do shiquimato porque retiram da alimentação os aminoácidos aromáticos que necessitam (Yamada e Castro, 2007). Já as plantas são obrigadas a produzir estes aminoácidos essenciais para sobreviverem e se multiplicarem (Gruys e Sikorski, 1999).

Devido aos muitos benefícios que a utilização do glifosato propicia, tanto economica como ecologicamente, as pesquisas visando a obtenção de culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato foram baseadas principalmente em três mecanismos de resistência: (1) super-produção da enzima EPSPS nas plantas; (2) introdução de uma forma insensível da enzima EPSPS na planta; (3) introdução de genes com a capacidade de metabolizar o glifosato (Pline-Srnic, 2006).

Atualmente, todas as culturas tolerantes ao glifosato apresentam o gene resistente da EPSPS (Pline-Srnic, 2006); e nalgumas culturas pode-se encontrar o gene que expressa a capacidade de metabolizar o glifosato (Padgett *et al.*, 1996).

Modo de ação secundário

O processo primário das plantas é a fotossíntese na qual elas utilizam a energia solar para a produção de compostos orgânicos, agrupados pelas suas características em metabolitos primários e secundários. Os metabolitos primários, essenciais para a sobrevivência dos organismos são os glícidos (açúcares), aminoácidos, ácidos gordos, nucleótidos e os seus polímeros. O grupo reduzido destes metabolitos serve como precursor para síntese de outros compostos em reações catalisadas enzimaticamente. Estes compostos são chamados metabolitos secundários: ácido shiquímico (precursor de vários compostos aromáticos), acetato (precursor de ácidos gordos, polifenóis, isoprenos, prostaglandinas, etc.) e aminoácidos alifáticos (biossíntese de alcalóides) (Yamada e Castro, 2007).

O glifosato é um herbicida que afeta a síntese de metabolitos secundários devido ao bloqueio da via do ácido shiquímico, com muitas implicações ecológicas (Lydon e Duke, 1989). Entre os efeitos, inclui-se a síntese de ácido indolilacético (IAA) e de outros compostos vegetais, síntese de clorofila, síntese de fitoalexinas e de lenhina, síntese de proteínas, fotossíntese, respiração, transpiração, permeabilidade de membranas entre outros (Yamada e Castro, 2007).

Na planta, a auxina IAA, promotor de crescimento, provém do triptofano, através de várias etapas, que envolvem o indolpiruvato ou a triptamina ou o indoletanol para formar indolilacetaldeído, ou glucobrassicina, para originar indolilacetoneitrilo, compostos precursores do IAA. A biossíntese de IAA é inibida pela ação do glifosato que inibe a síntese de corismato e de triptofano. Na biossíntese do IAA em plantas e bactérias verifica-se a possibilidade de ocorrência de quatro vias de síntese: a via do ácido indol 3-pirúvico, a via bacteriana, a via do indol-3-acetoneitrila (IAN) e a via da triptamina (TAM) (Yamada e Castro, 2007).

A biossíntese de IAA tem como precursor o indol-3-glicerol fosfato, que por sua vez depende de corismato para sua formação. Como a síntese de corismato também é inibida pelo glifosato, esta via também é inibida pelo herbicida. Foi demonstrado que o glifosato exerce uma rápida redução no teor de auxina nas plantas (Yamada e Castro, 2007).

O transporte de auxina é inibido por doses sub-letais de glifosato (Yamada e Castro, 2007). Baur (1979) demonstrou que a exposição ao glifosato causou uma inibição do movimento basípeto do ^{14}C -IAA localizado no ápice cortado de milho. Além disso, uma acumulação do composto marcado ocorreu na extremidade basal do segmento, o que, juntamente com a falta de difusão do marcador para o interior do bloco recetor localizado na extremidade basal, indicam ligação do IAA no interior do tecido (Yamada e Castro, 2007).

Outro importante promotor de crescimento das plantas é a giberelina. A biossíntese deste composto origina-se a partir do 3 acetilCoA, passando por ácido mevalónico, geranilgeranil pirofosfato e caureno, entre outros componentes da via metabólica. A auxina (IAA) promove a biossíntese de giberelina (Yamada e Castro, 2007).

Quanto à síntese de etileno, na biossíntese de aminoácidos e ureídeos verifica-se que a via se ramifica em síntese de triptofano, fenilalanina e tirosina (inibida pela presença de glifosato) ou em síntese de glicina, serina, cisteína e metionina. Esta segunda ramificação deve ser mais induzida quando a primeira é inibida, onde se nota a presença de metionina, precursora da síntese de etileno (Yamada e Castro, 2007).

O etileno pode inibir o metabolismo de fosfolípidos, aumentar a permeabilidade da membrana, causar perda de clorofila, aumentar a perda de cor das folhas, inibir a divisão e expansão celular, reduzir a síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN) e aumentar a atividade da celulase nas zonas de

abscisão. O aumento da atividade de celulase pode diminuir a resistência à abscisão (Yamada e Castro, 2007).

As plantas são seletivas quanto ao processo de absorção e liberação de substâncias para o meio ambiente. Dentro deste contexto, a molécula de glifosato, por ser um derivado de glicina (um aminoácido essencial presente nas plantas), não é considerada pelas plantas como um potencial agressor e, portanto, normalmente é muito pouco exsudada pelas raízes (Galli *et al.*, 2005).

Além da contaminação acidental, a única outra maneira da planta não-alvo receber e absorver o glifosato seria através dos resíduos (Yamada e Castro, 2007). Estudos afirmam que uma vez aplicado, o glifosato é rapidamente inativado no solo (Sprankle *et al.*, 1975; Prata *et al.*, 2000). No entanto, esta inativação parece não ser permanente ou rápida o suficiente, visto que há estudos que comprovam que a atividade residual foi capaz de causar danos na germinação e no desenvolvimento de determinadas culturas (Yamada e Castro, 2007).

Além do glifosato residual do solo e da sua transmissão a plantas não-alvo, existe ainda a possibilidade da passagem do glifosato da planta-alvo (infestante) para a planta não-alvo (cultura) que coexistam no meio, como no caso dos citrinos, cafeeiro e outras perenes, através do contato entre as raízes (Yamada e Castro, 2007).

Esta possibilidade foi comprovada por Rodrigues *et al.* (1982) ao estudar os efeitos da exsudação do glifosato de plantas de trigo plantadas com milho ou com soja no mesmo vaso. No caso do milho, o maior efeito observado foi a redução no peso do sistema radicular. Os autores comentam que os resultados obtidos suportam fortemente a ideia de que o glifosato é exsudado e é absorvido pelas raízes das plantas adjacentes.

Sprankle *et al.* (1975) observaram que a germinação de sementes de trigo, milho e soja semeadas em areia é pouco afetada pela dose de glifosato, ocorrendo o oposto com o crescimento, que foi muito baixo. No mesmo trabalho, Sprankle *et al.* (1975) estudaram o espectro da sensibilidade de sete espécies vegetais ao glifosato: linho, milho, soja, trigo, cevada, aveia e pepino, na procura por um bioensaio que permitisse a detecção deste produto no solo. Foi observado que, entre estas plantas, o linho foi a mais sensível, ficando o milho, a soja e o trigo no grupo intermediário, e entre as mais resistentes a cevada, a aveia e o pepino. Os autores observaram também que à medida que aumentava a concentração de glifosato havia dificuldade na emergência das folhas, e muitas vezes as folhas que conseguiam emergir apresentavam cloroses típicas, como as de deficiência de zinco.

Em cultura a probabilidade daqueles efeitos surgirem é baixa, principalmente em solos com textura média ou argilosa e com altos teores em matéria orgânica. No entanto, poderia ocorrer em solos mais arenosos, com a plantação logo após a dessecação com o glifosato (Yamada e Castro, 2007).

Como o glifosato e o fosfato competem pelo mesmo local de adsorção no solo, há a potencialização da ação deste herbicida com o aumento da dose de fósforo (P). No entanto, os autores observaram que esta ação do P pode ser neutralizada ao longo do tempo, entre a aplicação do herbicida e a sementeira, mesmo para doses elevadas de glifosato (Yamada e Castro, 2007).

2.2.2. Comportamento no ambiente

Quando o glifosato é aplicado, parte do produto é diretamente absorvido pela planta, a outra parte vai para o solo onde fica depositada. A parte do produto que é absorvida pelos tecidos vegetais contribui para reduzir a sua deposição no meio ambiente, podendo apenas atingir o solo aquando da decomposição da matéria seca dessas plantas (Galli e Montezuma, 2005).

O principal meio de degradação do glifosato é através dos microrganismos do solo e da água por processos aeróbicos e anaeróbicos, que o decompõem em compostos naturais. A sua capacidade de ser adsorvido pelas partículas do solo e de permanecer inativo até à sua total degradação, é uma das características mais importantes do glifosato. O glifosato é rapidamente degradado por microrganismos do solo, visto que a sua meia-vida média é de cerca de 32 dias (Galli e Montezuma, 2005). Este resultado foi obtido através de 47 estudos feitos em campos agrícolas e em áreas de reflorestamento em diferentes localidades do mundo (Giesy *et al.*, 2000).

As plantas são seletivas quanto ao processo de absorção e de libertação de substâncias para o meio ambiente (Galli e Montezuma, 2005). Neste contexto, a molécula de glifosato, que é proveniente da glicina, não é aceite pelas plantas como um potencial agressor e, portanto, é frequentemente pouco exsudada pelas raízes, o que foi demonstrado por diversos trabalhos, como por exemplo o desenvolvido por Coupland e Peabody (1981), onde se avaliou a quantidade de glifosato exsudado pelas raízes após aplicação em plântulas de gramíneas. A sua manutenção em laboratório com as raízes em água desionizada, permitiu a estes autores observarem que apenas 0,36% da dose aplicada sobre as mesmas foi exsudado pelas raízes. Na solução do solo, a concentração libertada seria adsorvida pelos colóides e iões metálicos presentes na solução e decomposta por microrganismos, ou seja, a concentração na solução do solo seria praticamente inexistente.

Outro trabalho feito neste sentido foi efectuado por Rodrigues (1979) que fez um estudo em estufa, onde verificou a possibilidade de ocorrência de exsudação do glifosato pelas raízes de trigo (5 a 30 plantas por vaso), e a possível influência no desenvolvimento das culturas de soja e de milho em sementeira direta. O autor verificou uma ligeira interferência no desenvolvimento das plantas de trigo apenas na densidade mais elevada (30). Nas densidades mais baixas (5 plantas por vaso), verificou-se o favorecimento do desenvolvimento das culturas indicadas.

O glifosato é um composto orgânico com uma rápida e elevada taxa de adsorção dos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e da matéria orgânica do solo. Este fato diminui substancialmente o risco de absorção radicular da molécula pelas plantas. Devido aos mecanismos de ligação, a absorção do glifosato torna-se um processo irreversível (Prata *et al.*, 2000). Devido à forma como o

glifosato é absorvido, bem como do seu principal metabolito, o ácido aminometilfosfónico (AMPA), o glifosato insere-se na categoria de resíduo-ligado (Prata, 2002; Prata *et al.*, 2003). Este corresponde à fração que não retorna à solução do solo, tornando-se assim, totalmente indisponível para as plantas.

Em condições de campo, a inativação do glifosato torna-se ainda mais rápida, devido a fatores que não são controlados, designadamente a maior atividade microbiana, que leva à aceleração da degradação do glifosato, maiores concentrações de cátions metálicos, principalmente o Ca^{2+} proveniente dos fertilizantes e dos corretivos, que podem formar complexos com o glifosato, menor estabilidade do teor de humidade do solo nas camadas superficiais, que normalmente concentra as moléculas na superfície exterior dos colóides, acelerando o processo de adsorção na matriz coloidal do solo e maior variação da temperatura do solo (Prata, 2002).

Alguns estudos mostraram que a adsorção do glifosato no solo ocorre em duas fases, a primeira fase é praticamente instantânea, contribuindo com a retenção de mais de 90% do total de produto aplicado, e a segunda um pouco mais lenta (Galli e Montezuma, 2005). Os mecanismos de adsorção do glifosato estão ligados à capacidade dos solos em adsorver iões fosfatados e também às concentrações de determinados cátions (Galli e Montezuma, 2005. Prata *et al.* (2000) verificaram que existe uma elevada taxa de retenção do glifosato num solo com baixa capacidade de adsorção de fosfato. Outro fator importante na adsorção de glifosato, é o teor de humidade à superfície do solo que pode apresentar uma variação muito elevada, principalmente nos primeiros milímetros do perfil do solo onde o glifosato é aplicado e onde há grandes variações do teor de humidade num curto espaço, o que pode acelerar a adsorção do glifosato. Devido à elevada adsorção do glifosato na matriz coloidal do solo, bem como à sua rápida degradação pelos microrganismos, é baixa a probabilidade de a molécula atingir as raízes das culturas perenes ou anuais, de forma a causar-lhe danos após a sua aplicação sobre as infestantes (Galli e Montezuma, 2005).

Em relação à solubilidade na água, o glifosato é um herbicida muito solúvel (Kollman e Segawa, 1995). Estudos feitos no sentido de avaliar a estabilidade da molécula mostraram que o glifosato é estável em água com pH 3, 5, 6 e 9, à temperatura de 35 °C. Verificou-se também que é estável à fotodegradação em pH 5, 7 e 9. Em solução tampão e em condições de iluminação natural a meia-vida do produto por hidrólise foi superior a 35 dias (Kollman e Segawa, 1995). Bronstad e Friestad (1985) também demonstraram que o glifosato apresenta baixa propensão à decomposição por hidrólise. Estudos efetuados em Manitoba no Canadá, evidenciaram que essa decomposição ocorreu devido à adsorção a sedimentos e à degradação microbiana (Kirkwood, 1979). Ghassemi *et al.* (1981) constataram que a taxa de degradação do glifosato na água, em geral, é menor devido à menor quantidade de microrganismos existentes na água comparando com a maioria dos solos. Estudos feitos em ecossistema florestal evidenciaram que o glifosato se dissipou rapidamente na água de lagoas com elevado teor de sedimentos em suspensão, mostrando uma meia-vida entre 1,2 a 1,5 dias (Feng *et al.*, 1990; Goldsborough *et al.*, 1993).

As propriedades do glifosato caracterizam este produto como tendo um reduzido impacto ambiental, tendo em conta o seu largo espectro de ação. O produto é degradado por microrganismos existentes no solo e na água. No solo é retido sob a forma de resíduo-ligado, enquanto na água é altamente solúvel, mostrando uma volatilidade e evaporação pouco significativas (Galli e Montezuma, 2005).

O solo é um sistema muito complexo, constituído por material mineral, matéria orgânica, microrganismos, água e ar, a alteração de uma dessas componentes pode causar variações nos restantes (Alexander, 1961). No solo podem-se encontrar populações complexas e variadas de microrganismos que podem interferir na qualidade dos mesmos, juntamente com os processos bioquímicos que lá ocorrem (Tiedje *et al.*, 1999). A presença de microrganismos no solo pode ser influenciada por diversos fatores designadamente as propriedades físico-químicas, matéria orgânica, humidade, temperatura, pH, sistemas de gestão entre outros (Alexander, 1961; Buckley e Schmidt, 2001). Sempre que é introduzida qualquer prática agrícola que interfira com os fatores anteriores podem-se perspetivar variações em populações específicas de microrganismos.

No ecossistema agrícola o glifosato não causa um impacto significativo sobre as populações microbianas devido à elevada diversidade de microrganismos e à composição físico-química dos solos (Galli e Montezuma, 2005). Grossbard e Harris (1979) concluíram que as concentrações de glifosato aplicadas à cultura e que poderiam causar alguma inibição da atividade e do desenvolvimento dos microrganismos são geralmente muito superiores às que poderiam estar disponíveis no solo após a aplicação no campo. Salientam também que o glifosato é altamente adsorvido ao solo, contribuindo para a sua inativação e indisponibilização. Segundo Roslycky, (1982) o glifosato aplicado ao solo não tem efeitos adversos nas populações microbianas.

O estudo efectuado por Gomez *et al.* (1989) mostrou que o glifosato não tem efeito prejudicial sobre os microrganismos do solo em condições de campo. No entanto, quando é utilizado na concentração de 1%, em condições laboratoriais, verificou-se uma afeção significativa de algumas estirpes de bactérias. Grossbard (1985) verificou que o glifosato provocou uma inibição do desenvolvimento dos microrganismos em condições laboratoriais mas que esse efeito dificilmente é observado no campo, onde se verifica o aumento do número de fungos à medida que se aumenta a dose de glifosato, visto que os microrganismos utilizam o próprio produto como substrato. O mesmo autor constatou que não há risco de a fertilidade do solo ser comprometida pelo uso de glifosato. Gomez e Sagardoy (1985) também estudaram o efeito de várias doses de glifosato sobre bactérias aeróbicas, microartrópodes e ácaros presentes no solo durante 96 dias em solo arenoso em região semi-árida em Buenos Aires, Argentina. Não se observaram alterações significativas que pudessem prejudicar a microflora e a mesofauna.

O aumento da atividade microbiológica do solo, devido à aplicação do glifosato tem sido observado em vários estudos, possivelmente devido à capacidade de muitos microrganismos utilizarem a molécula do glifosato como fonte de fósforo, que por vezes é escasso no solo (Liu *et al.*, 1991; Pipke *et al.*, 1987).

Um estudo feito por Pitelli (2003) demonstrou que a aplicação de glifosato ao solo aumenta a atividade dos microorganismos que utilizam a molécula de glifosato no seu metabolismo e, por isso, são favorecidos pelo aumento da dose do produto, concluindo que ocorre uma rápida dissipação do herbicida.

Quinn *et al.* (1988) e Amrhein *et al.* (1983) evidenciaram que há uma relação inversa entre a degradação do produto e o crescimento da população de microrganismos durante a degradação do glifosato. A população de microrganismos pode adaptar-se à aplicação do produto, tornando-se pouco sensível à sua presença, sendo capaz de crescer satisfatoriamente mesmo em concentrações elevadas.

Vários estudos efectuados, inclusivamente em áreas onde a aplicação de glifosato decorreu durante dezanove anos, não mostraram qualquer efeito adverso significativo sobre a microbiologia do solo (Hart, 1996) e não se observou impacto sobre a biomassa microbiológica, bem como sobre a mineralização de carbono e azoto, nas doses recomendadas (Biederbeck *et al.*, 1997). Haney *et al.*, (2000, 2002) também confirmam a degradação do produto sem impacto negativo sobre as populações microbianas do solo. Da mesma forma, Giesy *et al.* (2000) concluíram num estudo de avaliação do risco ecotoxicológico para a molécula de glifosato que, nas doses recomendadas, não há qualquer evidência que mostre que o produto possa danificar a microbiologia do solo.

2.2.3. Mecanismos de resistência adquirida

O herbicida apresenta um local específico de atuação dentro da planta, onde a sua ação dificulta um processo ou função particular dentro da mesma. Esse local específico às vezes é alterado e a molécula herbicida torna-se incapaz de exercer a sua ação fitotóxica (Christoffoleti, 2008). Alguns exemplos de grupos de herbicidas que apresentam esse mecanismo de resistência são: Grupo A (inibidores da ACCase), Grupo B (inibidores da ALS), Grupo C (inibidores de Fotossistema II) e Grupo K (inibidores da formação da tubulina). Este tipo de mecanismo apresenta menor interação com o ambiente (Vidal e Merotto, 2001).

A resistência de populações de infestantes, em função do metabolismo do herbicida a compostos não fitotóxicos é um mecanismo de resistência em que a planta degrada o herbicida antes que este lhe cause danos irreversíveis. Duas das enzimas mais frequentes no processo são a citocromo P₄₅₀ monoxigenase e a glutatona (reações de oxidação e conjugação) (Christoffoleti, 2008). Alguns exemplos de grupos de herbicidas que apresentam este mecanismo de resistência são: Grupo A (inibidores de Acetil Coenzima A Carboxilase (ACCase), Grupo B (inibidores de Aceto Lactato *Sintase* (ALS)), Grupo D (inibidores de Fotossistema I), Grupo C (inibidores de Fotossistema II), Grupo K (inibidores da divisão celular), Grupo O (auxinas sintéticas) e Grupo G (inibidores da 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato *sintase* (EPSPS) (Vidal e Merotto, 2001).

Metabolização do herbicida

A velocidade de metabolização pode variar com a espécie, o estado de desenvolvimento da planta e com a temperatura a que está exposta, isto é, depende do ambiente. Assim, uma mesma quantidade de herbicida aplicada a uma espécie pode tornar-se fitotóxica sob determinadas condições e não produzir nenhum dano noutras (Christoffoleti, 2008). Geralmente, a capacidade metabólica é regulada por diversos genes, o que diminui a probabilidade de desenvolvimento desse tipo de mecanismo de resistência (Kissmann, 2003). Para Christoffoleti (1997), este processo é comum em diversos herbicidas com diferentes modos de ação.

Redução de concentração do herbicida no local de ação

Algumas plantas têm capacidade de sequestrar os herbicidas sem que o mesmo alcance o local de ação na planta, numa concentração suficiente para que ocorra o controle. Estas baixas concentrações podem ocorrer devido à redução na retenção do herbicida pela superfície foliar, redução da absorção ou translocação na planta, ou pela ocorrência de fenómenos de sequestro em organelos celulares (ex: vacúolos). Alguns exemplos de grupos de herbicidas que apresentam este modo de resistência são: Inibidores de ACCase (Grupo A), inibidores do Fotossistema I (Grupo D) e inibidores de EPSPS (Grupo G). No caso do herbicida glifosato, a confirmação de sequestro no vacúolo é muito recente (Ge *et al.*, 2011). De fato, os estudos em relação à base do mecanismo de resistência envolvido, ainda eram limitados, mas já em 2008 se sugeriam, pelo menos, dois mecanismos. Um deles está relacionado com a alteração do local de ação do herbicida através de mutações no gene que codifica a síntese da EPSPS, com mutações mais frequentes na prolina n.106 da enzima, sendo substituída por uma serina ou por uma treonina (Christoffoleti, 2008). Em alternativa, a resistência tem sido causada em plantas resistentes ao glifosato como resultado da redução na translocação do glifosato para as regiões meristemáticas das plantas resistentes (Powles e Preston, 2006).

Perda de afinidade do herbicida pelo local de ação na enzima

O entendimento dos processos (bioquímicos e fisiológicos do metabolismo das plantas) através dos quais as infestantes desenvolvem resistência aos herbicidas (mecanismo de resistência) é importante no sentido de desenvolver estratégias eficazes na gestão na resistência aos herbicidas (Nandula, 2010). Atualmente estão identificadas pelo menos cinco mecanismos de resistência a herbicidas em plantas:

- (1) alteração do local alvo devido a uma mutação no gene que codifica a enzima alvo (local de ação do herbicida), resultando numa perda de inibição parcial ou completa da atividade da enzima ou da ação do herbicida;
- (2) inativação metabólica, causando a transformação da substância ativa do herbicida em metabolitos não fitotóxicos;

(3) absorção reduzida e/ou translocação resultando num movimento restrito de níveis letais do herbicida para o local de ação;

(4) sequestro/compartimentação através do qual o herbicida fica imobilizado em locais celulares como vacúolos ou paredes celulares; e

(5) amplificação/sobre-expressão do gene da enzima correspondente ao local de ação que levará consequentemente à diluição do herbicida em relação ao local de ação.

Estes mecanismos são responsáveis pela resistência a herbicidas de muitas famílias químicas e, no caso particular do glifosato podem ocorrer em simultâneo na mesma planta.

Novos mecanismos de resistência ao glifosato serão, muito provavelmente, descobertos no futuro através de novas técnicas tais como o estudo genómico das plantas (Nandula, 2010).

Existem pelo menos três mecanismos de resistência que podem explicar o desenvolvimento da resistência a herbicidas que dependem, em grande parte, do modo de ação destes compostos, designadamente a perda de afinidade do herbicida pelo local de ação na enzima, a metabolização do herbicida a substâncias menos fitotóxicas e a redução da concentração do herbicida no local de ação, provocadas por alterações na absorção foliar ou translocação do herbicida pela população resistente (sequestro ou compartimentalização) (Christoffoleti, 2008).

2.2.4. Resistência adquirida ao glifosato no mundo

A resistência ao glifosato, da qual não havia registo até há cerca de uma década atrás quando o glifosato estava já no comércio há 20 anos, é provavelmente um dos maiores problemas que os agricultores produtores de culturas GM enfrentam neste momento, bem como proprietários de terras em sistema de não mobilização (Nandula, 2010).

O glifosato foi considerado em 2008 como o herbicida do século (Duke e Powles 2008). Várias propriedades do glifosato, como a sua elevada eficácia e o seu amplo espectro de ação, as suas propriedades ambientais e toxicológicas consideradas seguras, a rápida translocação, o seu modo de ação único de atuar ao nível da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), o baixo custo de formulações genéricas de glifosato e a adoção generalizada de culturas geneticamente modificadas (GM) tolerantes ao glifosato (GR) foram essenciais para justificar esta classificação (Nandula, 2010). Em relatórios anteriores foi colocada a hipótese de que a resistência ao glifosato em infestantes teria baixa probabilidade de ocorrer no campo devido à inatividade do glifosato no solo - que resultaria em pressão de seleção de curta duração, à ineficácia de culturas GM - devido à baixa afinidade do fosfoenol piruvato (PEP- um substrato da via do shiquimato) (Kishore e Shah 1988), às propriedades benéficas do herbicida para o ambiente e ao improvável desenvolvimento de processos que estão envolvidos na resistência ao glifosato em condições normais de campo (Bradshaw *et al.* 1997).

Os fatores envolvidos na seleção de resistência ao herbicida por parte da planta (ver capítulo/secção 1.2) incluem a mutação genética, o aparecimento de alelos resistentes, a hereditariedade, a adaptabilidade da infestante na presença ou não do herbicida, o sistema reprodutivo, o fluxo de genes e as práticas culturais que favorecem a manutenção limitada de determinadas espécies infestantes dominantes (Jasieniuk *et al.* 1996; Owen 2001; Thill e Lemerle 2001). Algumas infestantes GR possuem características destes fatores que podem contribuir para o aparecimento da resistência ao glifosato, incluindo a elevada variabilidade genética, a produção prolífica de sementes, a dispersão de sementes a longas distâncias e a polinização cruzada (Nandula, 2010).

O primeiro caso registado de resistência de uma espécie infestante ao glifosato foi identificado em *Lolium rigidum* Gaud. (Pratley *et al.* 1996). Powles *et al.* (1998) confirmou a resistência desta espécie infestante ao glifosato, numa população de *L. rigidum* de um pomar na Austrália onde eram efetuadas duas a três aplicações de glifosato por ano, durante 15 anos e que exibiu uma capacidade de resistência muito elevada quando comparada com uma população suscetível (Nandula, 2010). Em meados de 2010, eram já identificadas 18 espécies infestantes resistentes ao glifosato (Heap, 2010). No final de 2010, a resistência ao glifosato foi documentada pela primeira vez em espécies infestantes um pouco por todo o mundo, designadamente, *Lolium rigidum* Gaud., *Eleusine indica* (L.) Gaertn., *Conyza canadensis* (L.) Cronq., *Lolium perenne* L., *L. multiflorum* (Lam.) Husnot, *Conyza bonariensis* (L.) Cronq., *Plantago lanceolata* L., *Parthenium hysterophorus* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., *Ambrosia trifida* L., *Sorghum halepense* (L.) Pers., *Amaranthus rudis* Sauer, *Amaranthus palmeri* S. Wats., *Digitaria insularis* L. Mezex Ekman, *Euphorbia heterophylla* L., *Echinochloa colona* (L.) Link, *Kochia scoparia* (L.) Schrad., *Urochloa panicoides* Beauvois e *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. H. Walker (Nandula, 2010).

2.3. Avoadinha-peluda (*Conyza bonariensis* (L.) Cronq.)

2.3.1. Classificação, origem e distribuição

A espécie *Conyza bonariensis* (L.) Cronq, pertencente à família Asteraceae, é conhecida popularmente como avoadinha-peluda (Rocha, 1996). Apresenta ampla adaptação ecológica e é uma infestante importante de culturas perenes e anuais sob sistema de sementeira direta, mobilização mínima e em áreas de fruticultura (Brown e Whitwell, 1988; Bhowmik e Bekech, 1993). Ocorre também de em grandes densidades em áreas de pousio, antes da sementeira da cultura de verão, e em áreas abandonadas, inclusive no perímetro urbano (Kissmann e Groth, 1999).

É uma planta nativa da América do Sul e encontra-se distribuída um pouco por todo o mundo (cosmopolita). É considerada uma planta infestante, sendo facilmente encontrada em campos cultivados, beira de estradas e baldios (Kissman e Groth, 1997). Nesta espécie desde os anos 90 que se conhecem várias populações com resistência adquirida a herbicidas da família química bipiridilos (Heap, 2012). As populações resistentes ao paraquato apresentam um sistema de defesa antioxidante enzimático que protege a planta contra a ação desse herbicida, sendo considerada uma planta de difícil controlo (Pyon, 2004)

A espécie *C. bonariensis* (L.) Cronq. é uma planta anual, herbácea, cuja altura depende das condições do seu desenvolvimento. O caule é erecto, cilíndrico, até 15 mm de espessura, em geral com pequenas ramificações, glabro ou curto-piloso no ápice. A raiz principal é pivotante. As folhas são alternas e pubescentes de 1,5 a 10 cm de comprimento e 0,5 a 2,5 mm de largura (Franco, 1984; Lopez e Álvares, 1996). A inflorescência é terminal e axilar, formada por capítulos isolados e pedunculados. As flores são marginais de corola ligulada e esbranquiçadas, e as flores centrais são hermafroditas de corola tubulosa e branco-amarelada. A reprodução ocorre por sementes, em ciclos de 100 a 120 dias. A floração predomina nos meses de setembro a outubro (Leitão, 1972; Franco, 1984).

A espécie em estudo apresenta as seguintes sinónimas: *Erigeron bonariensis* L., *Erigeron floribundus* Sch. Bip., *Erigeron sordidus* Hook. e Arn., *Erigeron undulatus* Moench, *Conyza chenopodioides* DC., *Conyza erigeroides* DC., *Conyza floribunda* Kunth. A classificação mais recente e mais usada é *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. (IPNI, 2012). Além disso, apresenta outras sinónimas frequentemente utilizada noutros países como *Conyza albida* Willd., *Erigeron linifolius* Willd. e *Erigeron floribundus* (Kunth).

A espécie tem como característica marcante a libertação de cípselas maduras que são espalhadas pelo vento, garantindo, assim, a disseminação da espécie (Kissman e Groth, 1997).

Dentro da mesma espécie existem variedades, que se diferenciam nalgumas características botânicas. A *Conyza bonariensis* apresenta três variedades, var. *bonariensis*; var. *microcephala* Cabr. y var. *angustifolia* Cabr.

2.3.2. Características botânicas

A espécie *C. bonariensis* é um terófito com comprimento até 60 cm, com caule revestido de pêlos curtos, aplicados e macios e pêlos setígeros, patentes e ralos. Caule inicialmente simples com panícula terminal; posteriormente formam-se eixos secundários e compridos a partir do eixo principal. As folhas são acinzentadas, tendo as inferiores uma dimensão de 5-8 X 0,5-1 cm, oblanceoladas, atenuadas na base e agudas no ápice. São folhas inteiras ou com 2-5 lobos de cada lado, aplicado-pubescentes e esparsamente setulosas, as distais com 1-3 X 0,2-0,3 cm, linear-oblongas, inteiras e sésseis. Capítulos abertos com 8-15 mm de diâmetro. Brácteas involucrais com 3-4 mm, hirsutas. Lígulas até 0,5 mm, menores que os estiletes e geralmente também menores que o papilho. Cípselas com 1,25-1,5 mm, esparsamente pubescentes. Papilho com 4-5 mm de cor esbranquiçada. Planta diplóide ($2n = 36$) (Franco, 1984).

2.3.3. Germinação e dormência

Esta espécie tem vindo a reduzir significativamente a produtividade de algumas culturas e também está a aumentar a sua frequência um pouco por todo o mundo, sobretudo em sistemas conservacionistas de gestão do solo devido à sua ampla adaptabilidade ecológica. Além disso, o uso

intensivo de herbicidas nesses sistemas aumenta a pressão de seleção contribuindo para a seleção de populações resistentes aos herbicidas utilizados (Guimarães *et al.*, 2000).

A maioria das espécies infestantes, como *C. bonariensis*, reproduz-se por propágulos seminais e o grande sucesso das sementes como órgão de perpetuação e disseminação dessas espécies deve-se à capacidade de distribuição da germinação ao longo do tempo (dormência e longevidade no solo) e do espaço (dispersão), tornando-se num grave problema na agricultura moderna (Guimarães *et al.*, 2000).

O conhecimento do efeito dos fatores ambientais (temperatura, oxigênio e água) que interferem diretamente no processo germinativo das espécies infestantes, auxilia na compreensão da dinâmica populacional dessas plantas em determinada região (Bewley e Black, 1994; Baskin e Baskin, 1998; Chachalis e Reddy, 2000). A presença de luz no processo germinativo também se torna essencial para a germinação, podendo induzir ou eliminar possíveis mecanismos de dormência (Guimarães *et al.*, 2000).

Um fator importante para a germinação de sementes é a temperatura, pois esta exerce influência na velocidade de absorção de água e sobre as reações bioquímicas que desencadeiam o processo germinativo (Bewley e Black, 1994; Marcos Filho, 2005).

A germinação das sementes só ocorre dentro de determinadas faixas de temperatura (Bewley e Black, 1994; Carvalho e Nakagawa, 2000; Cardoso, 2004), onde, num valor ótimo, se obtém a máxima germinação dentro de um menor intervalo de tempo (Baskin e Baskin, 1998; Cardoso, 2004). Sementes de diferentes espécies apresentam diferentes respostas germinativas quanto à temperatura ótima para a máxima germinação (Marcos Filho, 2005). Trabalhos com sementes de infestantes mostraram que estas atingem máxima germinação em diferentes faixas de temperatura (Chachalis e Reddy, 2000; Koger *et al.*, 2004).

Conhecendo a amplitude de temperatura em que as sementes de uma planta infestante germinam é possível prever as regiões que seriam potencialmente colonizadas por essa espécie, bem como as épocas do ano em que o seu estabelecimento teria maior sucesso (Martins, 2008).

A luz é um fator ecológico com grande influência no processo de germinação de sementes, determinando os seus limites e a taxa de ocorrência, agindo também na quebra e indução de dormência (Bewley e Black, 1994; Baskin e Baskin, 1998). O efeito da luz na germinação das sementes é regulado pelo fitocromo, através de mecanismos ainda pouco conhecidos (Baskin e Baskin, 1998).

As espécies vegetais podem ser classificadas como fotoblásticas positivas (necessidade de luz para iniciar as reações metabólicas da germinação), ou fotoblásticas negativas (não há exigência de estímulo luminoso) e indiferentes (não apresentam sensibilidade à luz) (Mayer e Poljakoff-Mayber, 1989). A *C. bonariensis* é fotoblástica positiva (Baskin e Baskin, 1998).

A maior exposição à luz de sementes de plantas infestantes em áreas de cultura pode ocorrer em situações em que elas estejam em menores profundidades. A presença de sementes em maiores profundidades, onde não há incidência de luz em quantidade suficiente para promover a germinação, pode ser a chave para estratégias de gestão de infestantes em áreas de cultura.

Alguns estudos sobre a germinação de sementes de *C. bonariensis*, em condições de temperatura e luz, foram realizados na América do Norte (Nandula, 2006) e no sul do Brasil (Vidal *et al.*, 2007). No entanto, são conhecidas variações nas respostas à temperatura quando se trabalha com genótipos adaptados a diferentes regiões - ecótipos - (Marks e Akosim, 1984; Sharma, 1987; Guimarães, 2000), tornando pouco segura a extrapolação desses resultados para outras regiões.

Alguns autores relataram que a luz pode ser (Rollin e Tan, 2006) ou não ser necessária para desencadear a germinação (Gorski, 1975). Quanto à emergência, um estudo realizado na Austrália, indicou que sementes de *C. bonariensis* emergiram apenas na faixa de 1-2 cm abaixo da superfície do solo e que a sua viabilidade foi curta (Walker *et al.*, 2006). No entanto, em condições de laboratório, a maioria das sementes de *C. bonariensis* emergiu à profundidade de 0,5 cm, poucas sementes a 1 cm e nenhuma semente a 2 cm (Rollin e Tan, 2006).

A propagação desta espécie dá-se através dos pseudofrutos secos coroados pelo papilho - cipselas - que facilmente se dispersam através do vento e da água. A semente encerrada na cipsela não apresenta dormência e pode germinar rapidamente em condições de temperatura e humidade favoráveis (Lazaroto *et al.*, 2008).

A maturação das sementes ocorre três semanas após a fertilização (Lazaroto *et al.*, 2008). O peso médio da semente é de 0,072 mg, sendo 15% representado pelo tegumento e 85% pelo embrião (Fenner, 1983). O número médio de sementes por capítulo em *C. bonariensis* situa-se entre 190 e 550 sementes, com média de 400 sementes por capítulo (Wu e Walker, 2006). O número de capítulos por planta e, conseqüentemente, a produção total de sementes é proporcional à altura do caule (Regehr e Bazzaz, 1979; Smisek, 1995).

A propagação de *C. bonariensis* dá-se apenas através de sementes (Lazaroto *et al.*, 2008). Assim, ocorrem adaptações nas cipselas para facilitar a dispersão das sementes através do vento, as quais são formadas por estruturas designadas por *papilho* (Franco, 1984). O papilho mede, no mínimo, duas vezes o tamanho da semente, e a altura das plantas ajuda para que a semente flutue por um longo período de tempo (Regehr e Bazzaz, 1979). No entanto, a dispersão de sementes também ocorre através da água. Como se trata de uma espécie anual que se reproduz apenas por sementes e estas possuem adaptações para facilitar a dispersão, estes processos são determinantes para se obter redução das infestações, eliminando as populações estabelecidas antes da sua floração. Isso pode ser conseguido por controlo químico ou mecânico, tendo atenção especial às áreas não-cultivadas (terraços, linhas de cercas, beiras de estradas) e durante o pousio de áreas cultivadas (Lazaroto *et al.*, 2008).

As sementes maduras da avoadinha-peluda não apresentam dormência e podem germinar sempre que as condições de temperatura e humidade forem favoráveis (Wu e Walker, 2006). Em geral, as sementes de *C. bonariensis* germinam a temperaturas entre 10 e 25°C. Para a germinação de sementes de *C. bonariensis*, foi realizado um estudo na Austrália que constatou que a temperatura ótima é de 20°C (Rollin e Tan, 2006). Isso explica a emergência de plântulas no início do outono e no início da primavera, quando as temperaturas se aproximam dos 20°C (Lazaroto *et al.*, 2008). No entanto, as temperaturas mínima e máxima para germinação de *C. bonariensis* foram estimadas em 4,2°C e 35°C, respetivamente (Rollin e Tan, 2006).

Tendo em conta que as sementes de avoadinha-peluda necessitam de luz para germinar, pode-se impedir que isso aconteça durante a estação fria por recurso a mulches. Este processo, além de impedir também atrasa a germinação, dando tempo para que a cultura se estabeleça e suprima a população tardia de plantas que, eventualmente, venha a emergir (Lazaroto *et al.*, 2008).

Esta espécie tolera bem condições de deficiência hídrica e consegue manter o crescimento e a produção de sementes em condições de **estresse** hídrico (Lazaroto *et al.*, 2008). A avoadinha-peluda prefere solos acidatados, pedregosos e arenosos (Hanf, 1983) e, embora também colonize áreas planas e húmidas, não tolera inundação do solo (Smith e Moss, 1998).

Visto que a avoadinha-peluda se adapta melhor a determinadas faixas de pH do solo, a correção deste deve ser realizada de forma a atender às necessidades da cultura e que não favoreça a infestante. Portanto, a correção do solo não pode ser exagerada, mas equilibrada (Lazaroto *et al.*, 2008).

O crescimento da infestante, em forma de roseta, permite que ela fixe carbono e acumule energia a baixas temperaturas (Regehr e Bazzaz, 1979). Em condições de elevada radiação solar, a temperatura das folhas, situa-se frequentemente 10°C acima da temperatura ambiente. A temperatura ótima do ar para a fotossíntese varia de 28°C no verão a 15°C no inverno. Foi referido que o ponto de compensação luminoso decresceu de 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à temperatura de 25°C, para apenas 18 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 5°C (Lazaroto *et al.*, 2008). O tempo de resposta fotossintética das rosetas à irradiância é muito rápido, mesmo em baixas temperaturas (Regehr e Bazzaz, 1979).

Plantas que emergem na primavera possuem baixa mortalidade, mas produzem poucas sementes, comparando com as que emergem no outono (Buhler e Owen, 1997).

Em áreas de sementeira direta de soja, onde não foi realizado cultivo durante o inverno ou as culturas foram colhidas antecipadamente, ocorreu intensa infestação por avoadinha-peluda, o que obrigou ao seu controlo antes do estabelecimento das culturas de verão (Bruce e Kells, 1990). No Estado de Indiana, EUA, encontraram-se infestações de avoadinha-peluda em 63% das lavouras de soja cultivadas por dois anos seguidos, comparativamente à ocorrência de 51% em lavouras de soja sem rotação e a 47% quando houve rotação entre milho e soja. O uso de rotação de culturas pressupõe também a possibilidade de alterar os herbicidas com diferentes modos de ação, medida fundamental

para se obter sucesso no controlo e na prevenção de resistência em populações de voadinha-peluda (Lazaroto *et al.*, 2008).

Geralmente, as espécies de *Conyza* não representam problemas em áreas de sistema convencional de cultivo (Brown e Whitwell, 1988).

O aumento da quantidade de resíduos de culturas atrasou a emergência de avoadinha-peluda no outono (Buhler e Owen, 1997). Dessa forma, como esta espécie não sobrevive à mobilização do solo, este é um ponto que pode ser explorado para limitar as infestações em áreas agrícolas. Caso haja impedimento para se mobilizar periodicamente o solo e considerando que no sistema de sementeira directa as sementes não são ou são pouco enterradas, pode-se utilizar esta característica para se obter germinação uniforme das populações, as quais poderiam ser eliminadas por métodos mecânicos ou por métodos químicos (herbicidas) quando surgissem na área (Lazaroto *et al.*, 2008).

2.3.4. Resistência a herbicidas

Em 1980, investigadores japoneses relataram o primeiro caso de resistência de *C. canadensis* (L.) Cronquist a um herbicida, quando detetaram uma população resistente ao paraquato (Heap, 2006). O modo de resistência ao paraquato consiste no sequestro da molécula herbicida no vacúolo e/ou no aumento da atividade de desintoxicação de enzimas, como da superóxido dismutase. A frequente utilização de herbicidas gerou o aparecimento de populações de *Conyza* resistentes nos anos seguintes (Lazaroto, 2008).

Actualmente, seis e treze países, respetivamente, já referiram casos de populações de *C. bonariensis* e *C. canadensis* resistentes para herbicidas com diferentes modos de ação, tais como inibidores dos fotossistemas I (C1) e II (D) da enzima EPSPS (G) e da enzima ALS (B). Conhecem-se ainda casos de resistência múltipla entre o glifosato e diferentes herbicidas, designadamente paraquato e sulfonilureias (Heap, 2006). Foram identificados, em 11 países, 19 casos de resistência múltipla em *C. bonariensis* e 49 casos em *C. canadensis* em 13 países (Heap, 2012).

Foram encontradas populações resistentes de *C. canadensis* ao grupo de herbicidas inibidores da enzima ALS foram encontrados inicialmente nos EUA e na Polónia, no início da década de 2000, em culturas produzidas em sistema de sementeira directa e nas bermas das estradas, respetivamente (Heap, 2006). O primeiro caso de *C. canadensis* resistente ao herbicida glifosato ocorreu nos EUA em 2001 (Van Gessel, 2001). Desde então, o problema evoluiu em vários Estados americanos. Populações desta espécie resistentes ao glifosato foram encontradas em áreas onde ocorreram as seguintes práticas de gestão: cultura de soja na mesma área por vários anos consecutivos (até 14 anos), uso único de glifosato para controlar infestantes e reduzida mobilização do solo (Lazaroto, 2008).

As plantas das espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis* têm-se caracterizado como espécies que apresentam uma adaptabilidade ecológica eficaz em sistemas de conservação do solo, como

sementeira direta ou mobilização mínima de solo. Estes sistemas obrigam a uma pressão de seleção muito elevada, causada pela intensa utilização do glifosato em culturas de soja, milho, algodão ou beterraba-sacarina em que se utilizam genótipos transgénicos, favorecendo a seleção de populações resistentes. A resistência encontrada em populações destas espécies deve-se à limitada translocação do glifosato para os pontos de crescimento das plantas (Koger e Reddy, 2005). No entanto, Mueller (2003) constatou que a resistência de populações de *Conyza* spp. não se dava em função da translocação do herbicida ou da alteração enzimática, pois não houve diferença na acumulação de shiquimato nas plantas aos dois e quatro dias após a aplicação de glifosato, comparando entre populações resistentes e suscetíveis. Este autor sugeriu a possibilidade de existirem isoenzimas 5-enol-piruvil shiquimato fosfato sintase (EPSPS) em plantas resistentes, os quais possuiriam menor afinidade com a molécula de glifosato, conferindo o carácter de resistência às plantas.

Algumas populações de *C. canadensis* já desenvolveram resistência múltipla a herbicidas com diferentes modos de ação. Na Hungria, foram encontradas populações resistentes simultaneamente aos herbicidas paraquato e atrazina. Em Israel e nos EUA foram identificadas populações resistentes aos compostos atrazina e chlorsulfurão, este um inibidor da enzima ALS (Heap, 2006). Esta resistência agrava sobretudo o controlo químico da avoadinha-peluda em tanto em áreas agrícolas como em áreas não-cultivadas. De entre as medidas preconizadas para a gestão da resistência de infestantes a herbicidas, a vigilância constante da cultura, no sentido de identificar possíveis focos, é essencial e as plantas suspeitas devem ser sistematicamente eliminadas (Lazaroto, 2008).

2.4. O herbicida flazasulfurão como alternativa ao glifosato

2.4.1. Modo de ação e comportamento na planta

A maioria dos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), [designadamente as sulfonilureias](#), apresentam elevada eficácia de controlo de infestantes e são muito usados na agricultura, sendo eficazes em doses baixas (g ha^{-1}) comparando com outros herbicidas mais antigos (kg ha^{-1}) (Christoffoleti, 2004). As doses baixas reduzem problemas de utilização, armazenamento na embalagem e na aplicação (Salmazo, 2009).

A atividade destes herbicidas é específica das plantas (a enzima ALS, local de ação destes herbicidas, não existe nos animais) por isso as sulfonilureias possuem toxicidade aguda e crónica muito baixa para os animais. A inibição não permite a síntese de aminoácidos valina, leucina e isoleucina, provocando uma paralisia da divisão celular e do crescimento da planta, pela sua ação na gema apical e em locais de crescimento das raízes. A rápida inibição da divisão celular é um efeito específico das sulfonilureias, visto que a divisão celular não é afectada com a mesma intensidade por outros herbicidas com vários locais de ação (Brown, 1990; Rodrigues e Almeida, 2005).

A seletividade das sulfonilureias a determinadas culturas baseia-se na rápida inativação metabólica (citocromo P45 monooxigenase) do produto pela planta e não na insensibilidade da ALS na cultura tolerante (Brown, 1990).

O sintoma típico de fitotoxicidade ocasionada pela aplicação do flazasulfurão, consiste na descoloração da parte mediana da lâmina das folhas centrais da planta, que se encontram em fase de expansão no momento da aplicação, sendo esse um dos sintomas mais expressivo até sete dias após a aplicação do produto. No entanto, existem cultivares tolerantes às sulfonilureias, que parecem metabolizar estes herbicidas mais rapidamente.

O modo de ação (MOA) das sulfonilureias consiste na inibição da síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina. A via biossintética desses três aminoácidos apresenta em comum o uso da ALS, que participa na fase inicial do processo metabólico, catalisando uma reação de condensação. Essa reação de condensação consiste na fusão de duas moléculas de piruvato, originando o acetolactato ou na condensação de uma molécula de piruvato com uma molécula de 2-cetobutirato, formando 2-aceto-2-hidroxi butirato, como o primeiro passo da biossíntese do aminoácido isoleucina. Cada um destes produtos é convertido posteriormente por outras três reações, catalisadas pelas enzimas aceto ácido redutor isomerase (KARI), dihidroxi ácido desidratase e amino transferase, resultando em valina e isoleucina (Christoffoleti, 2008). Na biossíntese da leucina, o precursor da valina 2-ceto isovalerato é ainda convertido numa série de quatro reações que utilizam as enzimas 2-isopropilmalato sintase, isopropilmalato isomerase, desidrogenase e aminotransferase (Duggleby e Pang, 2000).

Quando o herbicida se encontra presente dentro da célula de uma planta suscetível, ocorre uma inibição não competitiva pelo herbicida com o substrato, de tal forma que não ocorre a formação do acetolactato, indispensável para que as restantes reações ocorram e resultem na formação dos aminoácidos (Christoffoleti, 2008). A paralisação na síntese dos aminoácidos leva a uma interrupção na divisão celular e na consequente paralisação do crescimento da planta (Kissmann, 2003).

Os herbicidas inibidores da enzima ALS podem ser utilizados em pré- e pós-emergência com vias de absorção radicular e foliar, visto que há substâncias ativas com translocação quer pelo xilema quer pelo floema, acumulando-se nos meristemas de crescimento (Christoffoleti, 2008; Salmazo, 2009). Os sintomas característicos da ação destes herbicidas são cloroses das folhas novas e a necroses dos tecidos, que se verificam entre sete a catorze dias após a aplicação, apesar da interrupção no crescimento das plantas e a morte das regiões meristemáticas ocorrerem logo após a aplicação (Rodrigues e Almeida, 2005).

Nicolai (2005) avaliou/estudou o controlo de dois herbicidas inibidores da ALS, em seis espécies de plantas infestantes em três diferentes estados de desenvolvimento, e concluiu que para as aplicações em pós-emergência se deve respeitar o estado mais inicial das infestantes, altura em que as plantas são mais facilmente controladas. Dessa forma, é recomendado que os herbicidas inibidores da ALS, quando usados em pós-emergência, sejam aplicados nas monocotiledóneas antes do afilhamento e nas dicotiledóneas até às seis folhas (Christoffoleti, 2008). Deve-se também ter em conta os intervalos mínimos de sete dias entre o uso de herbicidas inibidores da ALS e inseticidas

organofosforados (como o carbamato), bem como entre as adubações de cobertura azotada, devido à possibilidade de interações fitotóxicas de antagonismo (Nicolai *et al.*, 2006; López-Ovejero *et al.*, 2003).

2.4.2. Comportamento no ambiente

O herbicida flazasulfurão é utilizado um pouco por todo o mundo para o controlo de plantas infestantes mono e dicotiledóneas de várias culturas (Oliveira *et al.* 2005).

Para se poder perceber o destino do flazasulfurão no ambiente, é essencial entender o efeito das propriedades do solo na sua retenção. Na solução do solo, as moléculas tendem a atingir o equilíbrio entre a fase absorvida e a que permanece em solução. Geralmente, a eficiência e mobilidade dos herbicidas decrescem com o aumento da sua adsorção pelos colóides do solo (Oliveira *et al.* 2005). A adsorção afecta os processos que regulam o seu destino no ambiente, como lixiviação, volatilização, degradação química e microbiológica, absorção pelas plantas e retenção superficial (Bailey e White, 1970; Koskinen e Harper, 1990).

Os sulfonilureias, geralmente, são compostos não-voláteis que possuem um protão ionizável do grupo amino adjacente ao grupo sulfonil, comportando-se, portanto, como ácidos fracos, com pK_a na faixa de 3 a 5 (Brown, 1990; Hay, 1990). Por esta razão, a sua solubilidade na água a pH 7 é aproximadamente dez vezes maior que em pH 5 (Blair e Martin, 1988; Smith, 1995). A hidrólise dos herbicidas do grupo sulfonilureias depende da temperatura e do pH (Oliveira *et al.* 2005). O pH da solução controla a hidrólise porque a forma neutra da sulfonilureia é consideravelmente mais suscetível à hidrólise que a forma iónica. Segundo Smith (1995), a persistência das sulfonilureias em meio aquoso a 45 ° C e pH 5,0 foi de 1,7; 0,6; 2,1; e 0,4 dias, enquanto em condições similares a pH 7, os dados de persistência foram de 51, 14, 33 e 6 dias, respetivamente. Bertrand (2003) observou que o herbicida flazasulfurão teve rápida degradação em álcool (metanol ou etanol) a 30°C e que a hidrólise é dependente do pH.

A adsorção das sulfonilureias no solo varia de acordo com o teor de matéria orgânica, pH, textura e mineralogia dos solos (Thirunarayanan *et al.*, 1985; Mersie e Foy, 1985; Shea, 1986; Gonzales e Ukrainczyk, 1996; Werkheiser e Anderson, 1996). Devido à sua elevada solubilidade em água e fraca adsorção em solos com valores de pH neutros e alcalinos, as sulfonilureias apresentam grande potencial de lixiviação em condições de campo, principalmente em condições de elevadas precipitações (Blair e Martin, 1988; Hay, 1990; Brown, 1990; Smith e Aubin, 1993). Neste caso, pode ocorrer lixiviação dos herbicidas para camadas mais profundas do solo, que, geralmente, possuem propriedades diferentes das observadas em camadas superficiais (Oliveira *et al.* 2005). Variações nas propriedades do solo com a profundidade podem afetar a retenção, o movimento e a degradação dos herbicidas (Harper, 1988; Felding, 1997).

A degradação das sulfonilureias no solo aparenta a mesma dependência do pH observada em soluções tamponizadas em água (Smith e Aubin, 1993; Blair e Martin, 1988; Stork, 1995; Smith,

1995). Em solos ácidos, a degradação ocorre preferencialmente por hidrólise, enquanto em solos com altos valores de pH a hidrólise é bastante reduzida, e a degradação deve-se principalmente aos microorganismos do solo (Blair e Martin, 1988; Smith e Aubin, 1993; Smith, 1995).

A adsorção do flazasulfurão depende da afinidade do solo pela forma neutra, predominante quando $\text{pH} < \text{pK}_a$, e da forma aniônica, dominante quando $\text{pH} > \text{pK}_a$. A forma neutra do flazasulfurão pode ser absorvida pela matéria orgânica, enquanto a forma aniônica pode ser absorvida pelos grupos hidroxilas protonados dos óxidos de ferro e alumínio. O aumento de pH causa a diminuição na quantidade de flazasulfurão na forma neutra, que leva à redução na absorção pela matéria orgânica. O aumento do pH diminui o número de locais do solo carregados positivamente, levando ao decréscimo na absorção do flazasulfurão aniônico. Por isso, a absorção do flazasulfurão poderá diminuir com o aumento do pH, aumentando o seu potencial de lixiviação em solos cujo pH se aproxima da neutralidade. Como a absorção afeta a mobilidade e a degradação e, conseqüentemente, o potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, estudos sobre absorção e degradação em água do flazasulfurão contribuem para uma melhor percepção do seu comportamento e destino no ambiente (Oliveira *et al.*, 2005).

2.4.3. Mecanismos de resistência adquirida a sulfonilureias

O primeiro caso registrado de resistência de plantas infestantes a herbicidas inibidores da ALS foi relatado por Mallory-Smith *et al.* (1990) e Priminiani *et al.* (1990), que identificaram populações resistentes de *Lactuca serriola* L. em culturas de trigo, nos Estados Unidos da América, apenas cinco anos após a colocação no mercado do herbicida clorsulfurão. No caso das populações de infestantes resistentes a herbicidas inibidores da ALS, o mecanismo de resistência corresponde à alteração do gene responsável pela codificação da ALS, conforme enunciado por Shaner (1991). A sequência de aminoácidos da enzima ALS é alterada, de tal forma que estes herbicidas não conseguem provocar a inibição não competitiva, permitindo que a planta resistente produza os aminoácidos de cadeia ramificada mesmo sob a presença do herbicida no local de ação, caracterizando-se como perda da afinidade do herbicida pelo local da ação na enzima (Christoffoleti, 2008). Christoffoleti *et al.* (1997) e Vargas *et al.* (1999) observaram esse mecanismo respectivamente para *Bidens pilosa* L. e *Euphorbia heterophylla* L. resistentes a herbicidas inibidores da ALS, no Brasil.

Em todos os casos de resistência estudados, a resistência aos inibidores de ALS tem sido atribuída a alterações na sequência dos aminoácidos (Sathasivan *et al.*, 1990). A ALS é uma enzima composta por 670 aminoácidos e esta sequência é codificada por um gene nuclear. As mutações que ocorrem nos genes podem conduzir à substituição nos aminoácidos produzidos na sequência das bases aminadas, sendo que os cinco *locus* passíveis de mutação que resultam em resistência são simples e semi-dominantes, o que determina a alta frequência inicial das populações resistentes (Christoffoleti, 2008). A herança do alelo que confere resistência aos herbicidas inibidores da ALS é uma característica semi-dominante, permitindo a sobrevivência de indivíduos homozigóticos e heterozigóticos (Mallory Smith *et al.*, 1990), podendo também ser disseminada através dos grãos de pólen e por sementes, aumentando assim o fluxo genético que confere resistência para áreas

adjacentes (Christoffoleti, 2008). Christoffoleti (1993) verificou, através de estudos feitos em estufa e no campo, que não há diferenças na adaptabilidade ecológica de populações resistentes e suscetíveis aos herbicidas inibidores da ALS, portanto a mutação responsável pela resistência destas populações de infestantes não resultou em falhas genéticas para a população resistente. No entanto, pode haver autores com opiniões diferentes para outras espécies, herbicidas e mutações.

De entre todos os grupos químicos de herbicidas, o grupo B (Inibidores da ALS) é o que mais apresenta casos de resistência documentados, e que podem dever-se às seguintes razões (Tranel e Wright, 2002):

- Uso repetitivo na agricultura devido à ampla série de recomendações possíveis destes herbicidas, nas mais diversas culturas;
- A maioria dos herbicidas inibidores da ALS apresenta eficácia elevada sobre as infestantes, atingindo níveis de controlo próximos de 100%, o que leva à produção de sementes apenas das populações resistentes;
- Muitos herbicidas inibidores da ALS apresentam persistência prolongada no solo e consequentemente aumentam a pressão de seleção para populações resistentes;
- A elevada frequência inicial de populações resistentes devido a características genéticas;
- A adaptabilidade ecológica das populações suscetíveis e resistentes aos herbicidas inibidores da ALS é similar, garantindo a produção de sementes que escapem às pulverizações;
- A maioria dos casos de resistência aos herbicidas inibidores de ALS estudada apresenta resistência cruzada aos diversos grupos químicos de herbicidas que tem este mesmo modo de ação.

Estudos feitos por López-Ovejero *et al.* (2006) verificaram que populações de *Bidens pilosa* L. resistentes a herbicidas inibidores da ALS são menos tolerantes que populações resistentes de *B. subalternans* L. havendo ocorrência de resistência cruzada aos herbicidas inibidores da ALS do grupo das sulfonilureias e imidazolinonas para ambas as espécies. Isto indicia que certas espécies resistentes de infestantes têm alguma vantagem sobre outras, acelerando ainda mais o aparecimento de problemas na sua gestão (Christoffoleti, 2008).

III. Material e Métodos

Material vegetal

Nos ensaios realizados foram utilizadas duas populações de *Conyza bonariensis*, uma população suspeita de resistência (R), identificada como população B8 e uma população considerada suscetível (S), identificada como população C. Estas populações apresentam diferentes características quanto à origem, suscetibilidade ao glifosato e idade. As sementes da população R foram colhidas num pomar de citrinos em Ferreira do Alentejo, em Outubro de 2010, onde a gestão das infestantes é feita por recurso à aplicação de glifosato na linha e lavoura na entrelinha, com rega gota-a-gota. As sementes da população S foram colhidas num olival abandonado em Beja, onde nunca foi aplicado glifosato, em Junho de 2011. As sementes de ambas as espécies foram conservadas a uma temperatura de 4°C, na obscuridade em envelope de papel.

Ensaio desenvolvidos

Os trabalhos realizados no âmbito desta dissertação, englobaram ensaio de germinação de duas populações de *C. bonariensis*, uma suspeita de resistência ao glifosato (B8) e a outra conhecida como susceptível (C). Este ensaio teve a duração de 23 dias, com início a 13 de Fevereiro de 2012 e término a 7 de Julho de 2012. O ensaio de germinação com sementes de *C. bonariensis* foi feito para determinação da capacidade germinativa das populações e com o objetivo de obter plantas em número suficiente (que não foi possível, sendo necessário efetuar, posteriormente, novas sementeiras em vaso) para realização de ensaios de dose-resposta ao glifosato e ao flazasulfurão com planta inteira para confirmação de resistência adquirida ao herbicida glifosato. Foi também efetuado um ensaio de dose-resposta ao glifosato em placa de Petri, onde se aplicaram diferentes concentrações de glifosato (0; 0.05; 0.1; 0.2; 0.3 e 0.4 mg.mL⁻¹) (Sixto, H. *et al.*, 1997) no sentido de avaliar o efeito do glifosato em diferentes parâmetros (a capacidade germinativa, emergência e a taxa de mortalidade). O ensaio de dose-resposta ao glifosato em placa de Petri teve como objectivo desenvolver um método de resposta rápida, alternativo aos ensaios biológicos de dose-resposta com planta inteira, realizados em estufa que permita a confirmação da resistência adquirida ao herbicida glifosato em populações de *C. bonariensis*, independentemente do mecanismo responsável pela resistência. Este ensaio iniciou-se em 29 de Maio e terminou em 15 de Junho de 2012, tendo durado 17 dias. Para as mesmas populações efetuaram-se dois ensaio de dose-resposta ao glifosato com planta inteira. Foram aplicadas sete doses de glifosato (0; 180; 360; 720; 1440; 2880 e 5760 g s.a. L⁻¹) (Dinelli *et al.*, 2008), em que a dose normal correspondia a 720 g.ha⁻¹, com o objetivo de avaliar o efeito do herbicida na planta, através de análise de curvas de dose-resposta para o peso verde e para o peso seco. O peso verde foi calculado a 21 DAA (dias após aplicação de herbicida) e o peso seco a 23 DAA. Ambos os ensaios tiveram, uma duração de cerca de 3 meses, desde a sementeira até à determinação do peso seco. Foram efetuados, também, dois ensaios de dose-resposta ao flazasulfurão com duração idêntica ao do ensaio de dose-resposta do glifosato. Outro estudo realizado foi o ensaio do shiquimato, cujo objetivo seria de avaliar de forma indirecta o mecanismo de

resistência ao glifosato, através da acumulação de shiquimato na planta. Este último ensaio realizou-se entre 16 de Julho e 26 de Julho de 2012.

3.1. Germinação de sementes de populações de *C. bonariensis* suscetíveis e resistentes ao glifosato.

O ensaio para determinação da capacidade germinativa das populações de *C. bonariensis*, teve início em 13 de Fevereiro de 2012 e foi realizado em câmara de germinação CASSEL CBT, com registo do número de sementes germinadas (radícula > 2mm), ensaio esse que durou 23 dias.

Este ensaio iniciou-se com a preparação do substrato (Agar 1%). Após a preparação do meio Agar foram colocadas 25 sementes por cada placa de Petri (diâmetro 9 cm). Utilizaram-se 4 placas de Petri para cada população (correspondentes a 4 repetições), 25 sementes por placa de petri, o que fez um total de 100 sementes para cada população.

Ambas as populações foram sujeitas a condições de temperatura controlada e colocadas em câmara de crescimento a 20°C/20°C dia/noite, com um fotoperíodo de 16h. Ao longo do processo foram feitas observações de dois em dois dias, que consistiam no registo da germinação das sementes (Dinelli *et al.*, 2006, 2008).

3.2. Ensaio de dose-resposta ao glifosato

3.2.1 Ensaio em placa de Petri

Nos estudos de dose-resposta ao glifosato utilizaram-se sementes da população R (B8). O ensaio decorreu entre 29 de Maio de 2012 e 15 de Junho de 2012. Foram colocadas 25 sementes por placa de Petri em meio Agar 1%. As sementes foram colocadas em linha para facilitar posteriormente, a observação da germinação.

Foram utilizadas seis concentrações de glifosato de 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg mL⁻¹ e três repetições por cada concentração, tendo-se utilizado no total 450 sementes.

Ao longo do tempo, foi determinada a percentagem de germinação (sementes com radícula > 2mm) , de emergência (aparecimento dos cotilédones) e de mortalidade (clorose dos cotilédones).

As soluções de glifosato foram preparadas por diluição num volume de 100 mL a partir de uma solução-mãe de concentração contendo KNO₃ (0,4 mg.mL⁻¹ glifosato).

De seguida, procedeu-se à aplicação por adição de 5 mL de cada solução (contendo herbicida e KNO₃) nas respetivas placas de Petri. Na modalidade testemunha (0 mg.mL⁻¹), adicionaram-se, apenas, 5 mL da solução KNO₃ (0,2%) com o objectivo de induzir a germinação (Sixto, H. *et. Al*, 1997).

3.2.2 Ensaio com planta inteira

No estudo da dose-resposta ao glifosato com planta inteira foram realizados dois ensaios. As plantas no estado de duas folhas verdadeiras (BBCH 12) (Hess *et al.*, 1997) foram transplantadas para vasos de PVC de 7 cm de diâmetro e 10 cm de profundidade, com substrato de terra:turfa:areia (2:1:1) adubado com BLAUKORC, 12% N, 12% P₂O₅, 17% K₂O (20 g v/v). A rega foi efectuada por subirrigação, quando necessário e com solução nutritiva de 15 em 15 dias. O ensaio decorreu em estufa não climatizada em Oeiras em condições de temperatura mínima e máxima média de 15°C e 26°C, respetivamente.

O herbicida glifosato (RoundUp[®], 360 g s.a.L⁻¹, SL, Bayer) foi aplicado em plantas com 8 a 10 folhas (BBCH 108-110) nas doses de 0, 180, 360, 720, 1440, 2880 e 5760 g ha⁻¹ (a dose recomendada (N) corresponde a 720 g ha⁻¹), com um OPS (Oxford Precision System) com um débito de cerca de 8 L.m⁻² de herbicida (275 kPa) (Dinelli *et al.*, 2008). As plantas foram cortadas à superfície do solo 21 dias após a aplicação (DAA) e registou-se o seu peso verde e seco à temperatura de 25°C.

As plantas que apresentavam o meristema apical necrótico (21 DAA) foram consideradas como mortas. Foram efectuados dois ensaios, aplicando o mesmo método de estudo em ambos. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com 7 repetições por modalidade e por população no primeiro ensaio e 10 repetições no segundo ensaio.

3.3. Ensaio de dose-resposta ao flazasulfurão com planta inteira

As condições de crescimento das plantas foram idênticas às do ensaio anterior. As temperaturas mínimas e máximas médias foram de 16°C e 26°C, respetivamente.

O herbicida flazasulfurão (Katana, grânulos dispersíveis em água (WG) com 25% (p/p) de flazasulfurão, 200 g, Belchim) foi aplicado em plantas com 4 a 6 folhas nas doses de 0, 10, 20, 40, 80, 160 e 320 g. ha⁻¹ (a dose recomendada (N) corresponde a 40 g ha⁻¹), com um OPS (Oxford Precision System) com um débito de cerca de 8 L.m⁻² de herbicida (275 kPa) (Dinelli *et al.*, 2008). As plantas foram cortadas à superfície do solo 21 dias após a aplicação (DAA) e registou-se o seu peso verde e seco à temperatura de 25°C

As plantas que apresentavam o meristema apical necrótico foram consideradas como mortas. Foram efectuados dois ensaios, aplicando o mesmo método de estudo em ambos. O delineamento experimental foi totalmente casualizado, com 5 repetições por modalidade e por população para ambos os ensaios (Ensaio de dose-resposta aos herbicidas com planta inteira em Anexo).

3.4. Ensaio de determinação de shiquimato

Os estudos para determinação do shiquimato decorreram em duas fases. Numa primeira fase validou-se o método para o espectrofotómetro do Laboratório de Resíduos de Pesticidas (LRP) onde decorreram os ensaios, com plantas de *Lolium perenne*. Na segunda fase fez-se a determinação do shiquimato nas populações de *C. bonariensis*, em estudo.

O ensaio consistiu na adaptação do método do shiquimato de Cromatie e Polge (2000), desenvolvido para estimativa da concentração celular de shiquimato de duas populações de *C. bonariensis*, sujeitas a três modalidades de herbicida (T (0 g.ha⁻¹), 0,5 N (360 g.ha⁻¹) e N (720 g.ha⁻¹), correspondendo esta última à dose normal), em três tempos (24-h, 48-h e 72-h após aplicação) (Calha e Osuna, 2010). O ácido shiquímico foi extraído de amostras (de 50 mg de tecido vegetal fresco proveniente de 3 plantas) sujeitas a congelamento e detetado por espectrofotometria, pelo método descrito por Singh e Shaner (1998) e modificado por Cromatie e Polge (2000). Após a centrifugação, o ácido shiquímico presente no sobrenadante de 50 ml de solução, foi oxidado pelo ácido pirúvico e quantificado por espectrofotometria a 380 nm. A concentração de shiquimato foi expressa em microgramas por grama de peso fresco. Este método consistiu em três repetições de extracção. Foi efetuado um modelo logístico para relacionar o nível de shiquimato com a concentração de glifosato.

Após a aplicação de glifosato, a concentração de shiquimato é maior em plantas suscetíveis do que em plantas resistentes (até 4-6 vezes), constituindo um parâmetro útil na compreensão dos mecanismos de resistência presentes. No método utilizado, o shiquimato celular é extraído com HCl e oxidado com solução de periodato, obtendo-se ácido transaconítico. Este ácido é estabilizado pela adição de solução-mista NaOH/Na₂SO₃, solução responsável pelo desenvolvimento de cor (Cromatie e Polge (2000). A concentração celular de shiquimato é estimada por espectrofotometria a 380 nm.

A recta de calibração permite a conversão das leituras de absorvância em teores de shiquimato (µg.mL⁻¹). Estes teores são referentes aos 50 mg de peso verde, tendo sido necessário um cálculo adicional para se obter a concentração de shiquimato.

3.5. Análise de dados

Todos os resultados obtidos foram expressos em média ± erro padrão. De modo a determinar se existiam diferenças nos parâmetros estudados (germinação, emergência e mortalidade) relativamente às modalidades (populações, concentrações e tempo de aplicação do produto), efetuou-se uma análise de variâncias ("One-Way ANOVA") (Levene F-teste), seguido do teste de Tuckey. Para tal, foram previamente testados os pressupostos desta análise, i.e. a normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variâncias (Teste de Newman-Keuls). Sempre que não se verificaram os pressupostos com os dados transformados (log), foram utilizados testes de análise de variância não paramétricos (Kruskall-Wallis), seguido de comparações múltiplas.

O nível de significância para todos os testes estatísticos efetuados foi de 0,05. Para a realização dos testes referidos, utilizou-se o software STATISTICA SIGMA PLOT 7.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

Para os ensaios de dose-resposta foi utilizado o software DRC (dose response curve) da aplicação R i386 2.15.0 (Knezevic *et al.*, 2007), através do qual se procedeu à análise de variância (ANOVA) a um fator (modalidades), considerando o delineamento experimental totalmente casualizado, o que permite determinar se houve diferenças significativas entre doses e a necessidade de transformação da variável. Seguidamente ajustou-se um modelo de regressão não linear, do tipo logístico com 4 parâmetros, pois em ensaios biológicos a curva de dose-resposta típica segue a forma sigmóide

(Streibig, 1992). Neste trabalho, foi seguido o modelo logístico proposto por Streibig *et al.* (1993) e Kdusk *et al.* (1995) com a expressão:

$$Y=f(x)=c + ((d-c)/(1+(x/ED50)))^b$$

Em que y , corresponde ao peso verde ou seco das plantas de *Conyza bonariensis* (g) e x , à dose de herbicida (g.ha⁻¹). d , corresponde à assíntota superior da curva de dose-resposta, i.e., ao peso verde (g) obtido na dose mais reduzida do herbicida; c , à assíntota inferior da curva de dose-resposta, i.e., ao peso verde (g) obtido na dose mais elevada de herbicida; b , ao declive da curva de dose-resposta obtido ao nível do valor de $ED50$; O ajustamento do modelo aos dados foi verificado com o auxílio do teste F. se o teste F não for significativo ao nível de $P=0,1$, aceita-se a hipótese nula, do ajustamento dos dados ao modelo não linear ser significativamente melhor do que ao modelo linear, podendo-se concluir que a expressão descreve de forma adequada a variação sistemática dos dados (Seedfelt *et al.*, 1995).

IV. Resultados e Discussão

4.1 Germinação de sementes de duas populações de *C. bonariensis*

As curvas de germinação acumulada, na Figura 1, das duas populações de *C. bonariensis*, R e S, obtidas em meio agar a uma temperatura de germinação de 20/20 °C dia/noite e um fotoperíodo de 16h mostram tempos de latência mais longos para a população C. Quatro dias após o início do ensaio, a população B8 apresentava uma taxa germinativa de 72%, cerca de duas vezes superior à da população C, onde se verificara uma germinação de 37% das sementes. No último dia do ensaio, 23 dias após o início do procedimento, observaram-se percentagens de germinação significativamente diferentes entre as duas populações, 96% e 81% para a população B8 e C, respetivamente (Figura 1).

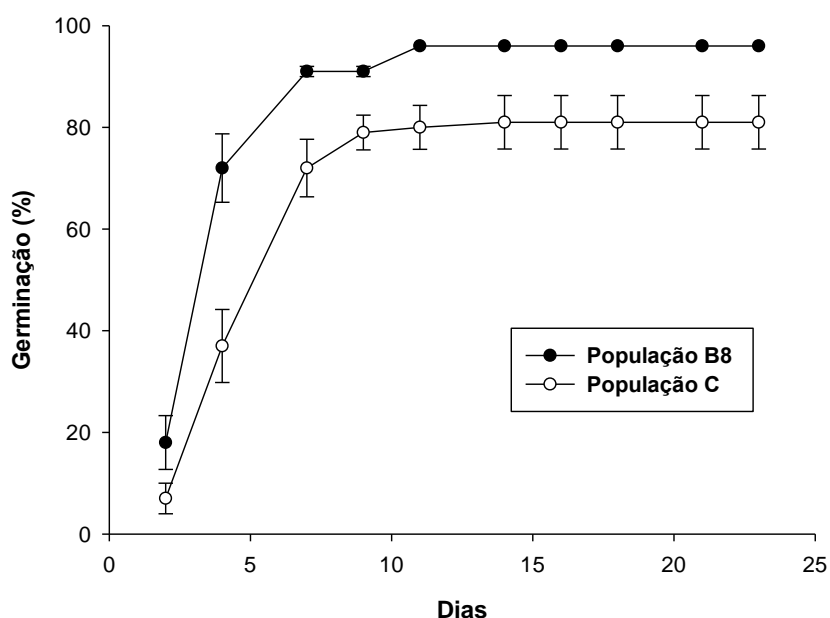


Figura 1. Germinação acumulada em meio agar de sementes de duas populações de *Conyza bonariensis* R (B8) e S (C) provenientes do Alentejo.

O valor de P ($<0,05$), obtido na análise de variância, bem como o grau de significância dos grupos homogêneos (Quadro 1), permitiram verificar que há diferenças altamente significativas na germinação entre as duas populações e ao longo do tempo, ou seja, a germinação das sementes depende da população e varia ao longo do tempo.

Quadro 1: Germinação de sementes de duas populações de *Conyza bonariensis*. * - homogeneidade de variâncias entre as populações B8 e C, para cada concentração: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre modalidades ($p < 0,05$).

População	Germinação (%)	Grupos Homogêneos
C	81,0	a
B8	96,0	b
ANOVA		Significativo
F	83.83366337	
P	5.39655E-13	

De salientar que a data de colheita das sementes foi diferente, a população B8 foi colhida em Outubro de 2010, enquanto a população C foi colhida em Junho de 2011. Todavia, no momento da colheita os propágulos estavam maduros. Quanto ao método de conservação foi igual para ambas as espécies, logo não parece haver relação entre a data de colheita e a germinação de cada população. No entanto as populações foram colhidas em locais diferentes do país. A população B8 foi colhida em Ferreira do Alentejo e a população C em Beja. Isto significa que as variáveis origem geográfica e suscetibilidade ao glifosato podem influenciar a germinação das sementes desta espécie. Situação similar observou Calha *et al.* (2008) em populações de *Alisma plantago-aquatica* resistentes e susceptíveis ao bensulfurão-metilo, em Portugal. Maiores taxas de germinação em populações de *Avena fatua* resistentes ao trialato e difenzoquato foram também observadas por Donovan *et al.* (1999).

4.2. Ensaio de dose-resposta ao glifosato em placa de Petri

Neste bioensaio sobre a influência da concentração de glifosato na germinação de *C. bonariensis*, verificou-se que o tempo de latência foi de 3 dias em todas as modalidades quer na população B8 quer na C (Figuras 2 e 3).

Em relação às taxa de germinação observadas (17 DAA), verificou-se, para cada uma das seis concentrações (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg.mL⁻¹) uma percentagem germinativa de 90,7%; 90,7%; 76,0%; 86,7%; 94,7% e 93,3%, respetivamente, para a população B8 (Figura 2) e uma percentagem germinativa de 78,7%; 84,0%; 90,7%; 93,3%; 84,0%; 88,0%, respetivamente para a população C (Figura 3).

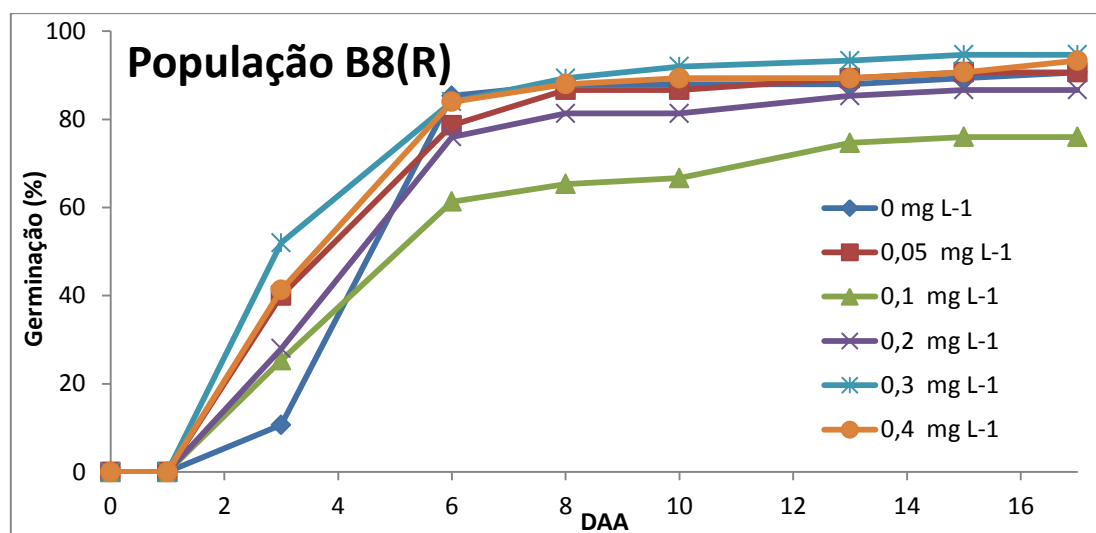


Figura 2. Germinação acumulada das sementes da população B8 em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).

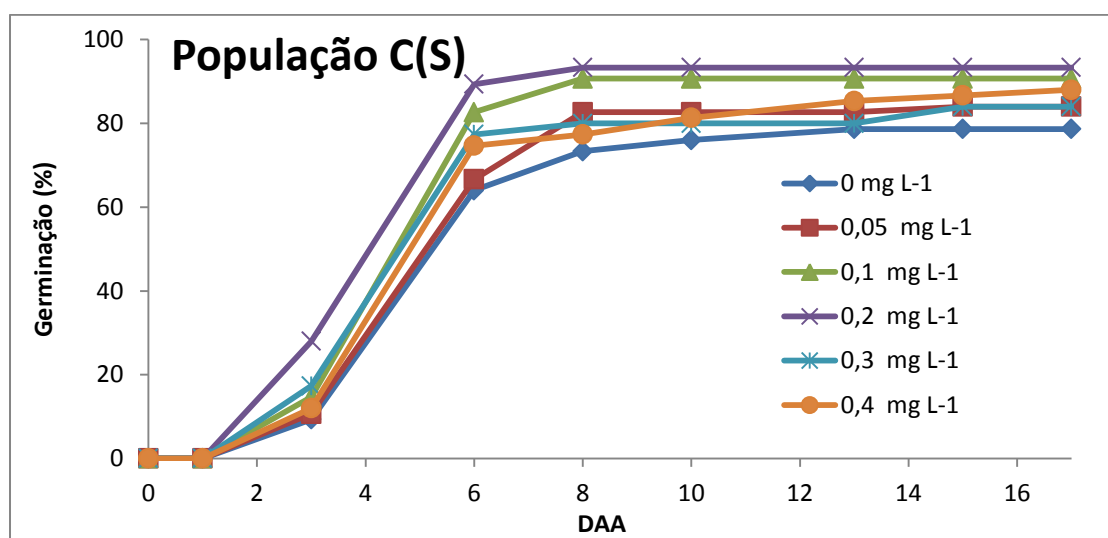


Figura 3. Germinação acumulada das sementes da população C em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).

Analisando o Quadro 2, ao comparar as populações B8 e C, em cada uma das concentrações, verifica-se a ausência de diferenças significativas entre elas, ou seja, as populações estudadas parecem ter um comportamento semelhante quanto à germinação, em cada uma das concentrações aplicadas ($P > 0,05$). Analisando os grupos homogêneos (*), verifica-se esta tendência, isto é, a ausência de diferenças significativas entre concentrações. Estes resultados estão em contradição com o ensaio anterior. Uma causa possível, poderá ser a heterogeneidade de repetições.

Quadro 2: Efeito da concentração de glifosato na germinação. de sementes de duas populações de *Conyza bonariensis* - média (erro padrão) -. * - homogeneidade de variâncias entre as populações B8 e C, para cada concentração: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre modalidades ($p < 0,05$).

Concentração (mg mL ⁻¹)	Germinação (%)		
	B8	C	*
0	90,67 (0,027)	78,67 (0,013)	a
0.05	90,67 (0,013)	84,00 (0,023)	a
0.1	76,00 (0,101)	90,67 (0,058)	a
0.2	86,67 (0,013)	93,33 (0,027)	a
0.3	94,67 (0,013)	84,00 (0,023)	a
0.4	93,33 (0,027)	88,00 (0,023)	a
ANOVA	Não significativo	Não significativo	
F	2,285294	2,866667	
P	0,111808	0,062662	

A emergência foi considerada no momento em que surgiram os dois cotilédones e a sua percentagem foi contabilizada apenas em relação às sementes germinadas. As primeiras emergências ocorreram 8 DAA para ambas as populações. No último dia do ensaio (17 DAA) verificou-se, para cada uma das seis concentrações (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg.mL⁻¹) uma percentagem de emergência de 98,53%; 97,06%; 96,5%; 86,2%; 87,3% e 91,4%, respetivamente, para a população B8 (Figura 4) e uma percentagem germinativa de 100%; 93,6%; 97,1%; 85,7%; 85,7% e 90,9%, respetivamente para a população C (Figura 5).

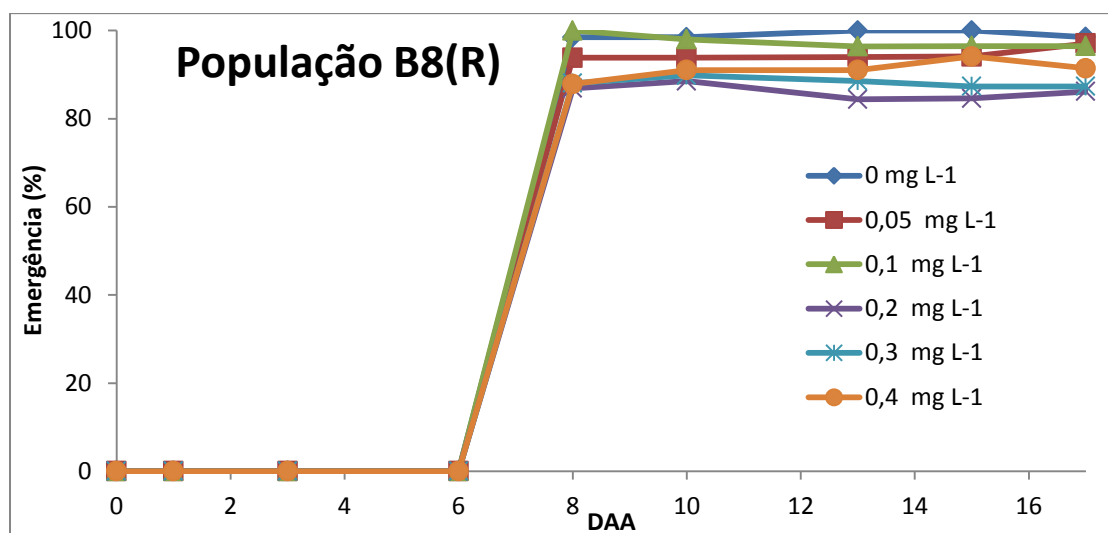


Figura 4. Emergência acumulada das sementes da população B8 em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).

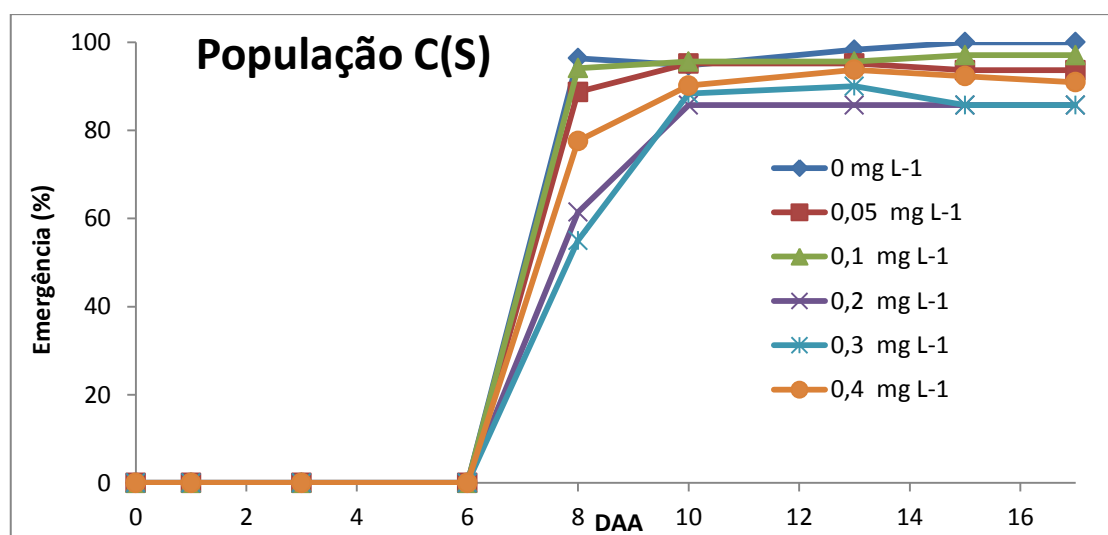


Figura 5. Emergência acumulada das sementes da população C em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).

Analisando os grupos homogêneos (*) do Quadro 3, verifica-se a ausência de diferenças significativas entre concentrações, ou seja, a emergência parece ser independente da concentração de glifosato. Analisando cada população, verificou-se que o glifosato não afectou a emergência da população B8, como se pode ver pelo valor de P ($>0,05$). No entanto, comportamento oposto se verifica para a população C, cuja emergência parece ser influenciada pela concentração de glifosato aplicada ($P < 0,05$).

Quadro 3: Efeito da concentração de glifosato na emergência de duas populações de *Conyza bonariensis* -média (erro padrão) –. * - homogeneidade de variâncias entre as populações B8 e C, para cada concentração: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre modalidades ($p < 0,05$).

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Emergência (%)		
	B8	C	*
0	98,53 (0,014)	100 (0)	a
0,05	97,06 (0,029)	93,65 (0,014)	a
0,1	96,49 (0,030)	97,06 (0,015)	a
0,2	86,15 (0,026)	85,71 (0,060)	a
0,3	87,32 (0,026)	86,71 (0,032)	a
0,4	91,43 (0,053)	90,91 (0,025)	a
ANOVA	Não significativo	Significativo	
F	2,901486	3,687729	
P	0,060609	0.029717	

A percentagem de mortalidade foi calculada apenas em relação às sementes germinadas, visto que a não germinação pode ter sido devida à falta de viabilidade das sementes e não ao efeito do herbicida. Assim, a mortalidade foi avaliada através da alteração da cor, ou seja, a partir do momento em que se começou a verificar clorose dos cotilédones das plântulas ou o seu amarelecimento. Esta clorose começou a verificar-se a partir do dia 6 de Junho (8 DAA), nas concentrações de 0,2 mg.mL⁻¹ e de 0,3 mg.mL⁻¹ para a população B8, e em concentrações mais elevadas, de 0,3 mg.mL⁻¹ e de 0,4 mg.mL⁻¹ para a população C. No último dia do ensaio, em 15 de Junho (17 DAA), verificou-se, para cada concentração de glifosato (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mg.mL⁻¹) uma taxa de mortalidade de 0%; 14,7%; 86,0%; 92,3%; 97,2%; 100%, respetivamente, para a população B8 (Figura 6) e de 0%; 73,1%; 95,6%; 98,6%; 100%; 100%, respetivamente para a população C (Figura 7). Verificou-se uma maior taxa de mortalidade, em ambas as populações, nas concentrações de glifosato mais elevadas.

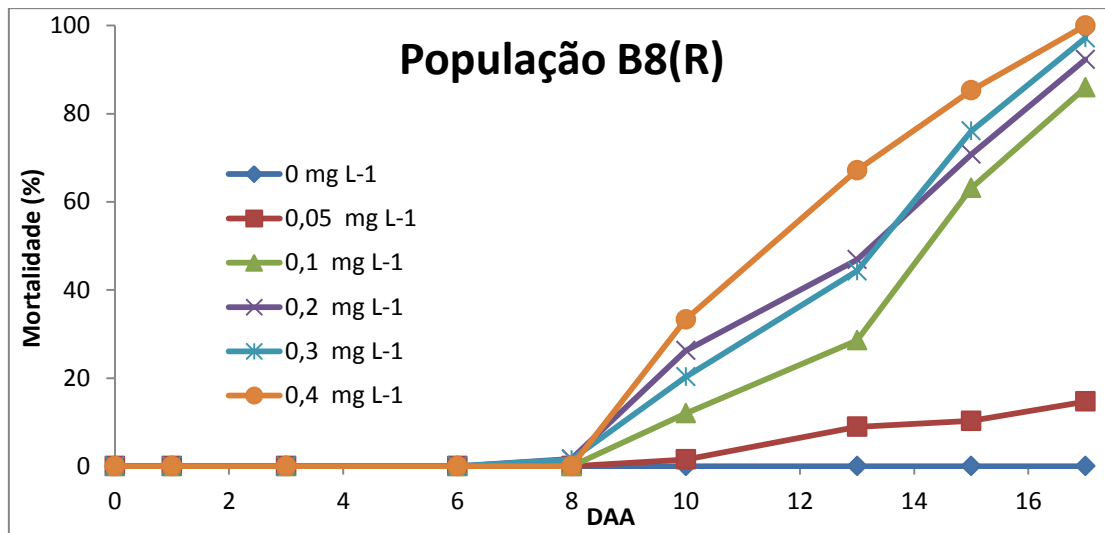


Figura 6. Mortalidade acumulada das plântulas da população B8 em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).

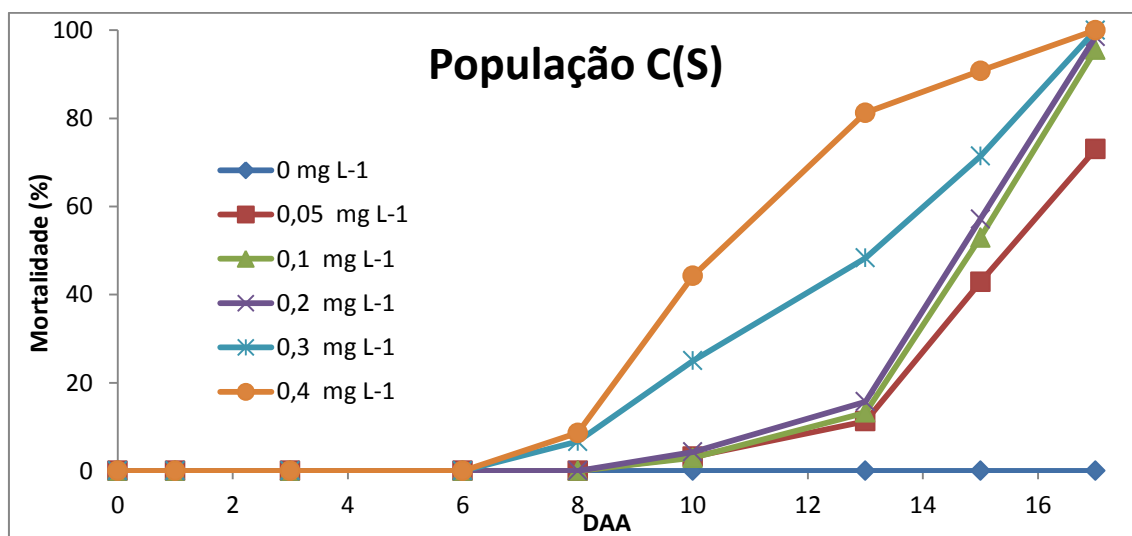


Figura 7. Mortalidade acumulada das plântulas da população C em placas de Petri, sujeita a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) de glifosato, ao longo do tempo (DAA - Dias após a aplicação de glifosato).

Analisando o Quadro 4, ao comparar as populações B8 e C, em cada uma das concentrações, verifica-se que há diferenças significativas entre a concentração 0,05 mg.mL⁻¹ e as restantes concentrações. Analisando individualmente, cada população, verifica-se a presença de diferenças significativas ao longo das concentrações aplicadas em ambas as populações, ou seja, como seria de esperar, a mortalidade das populações estudadas parece depender das concentrações de glifosato aplicadas, como se pode ver pelo valor de P ($<0,05$).

Quadro 4: Efeito da concentração de glifosato na mortalidade de duas populações de *Conyza bonariensis* -média (erro padrão); ns – diferenças não significativas; s – diferenças significativas; * - homogeneidade de variâncias entre as populações B8 e C, para cada concentração: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre modalidades ($p < 0,05$).

Concentração (mg.mL ⁻¹)	Mortalidade (%)		*
	B8	C	
0	0 (0)	0 (0)	c
0,05	14 (0,028)	73 (0,056)	d
0,1	84 (0,083)	96 (0,003)	a
0,2	92 (0,057)	99 (0,014)	ab
0,3	97 (0,014)	100 (0)	ab
0,4	100 (0)	100 (0)	b
ANOVA	Altamente significativo	Altamente significativo	
<i>F</i>	108,3537	277,7419	
<i>P</i>	1,48E-09	5.73E-12	

A análise de variância permitiu verificar que não existiam diferenças significativas entre concentrações na germinação e na emergência, o que indicia semelhante comportamento das populações B8 e C nestes dois parâmetros relativamente às diferentes concentrações de glifosato aplicadas, ou seja, parece não haver influência das concentrações utilizadas na germinação e na emergência das populações estudadas. Quanto à mortalidade, verificaram-se diferenças significativas entre a concentração 0,05 mg.mL⁻¹ e as restantes concentrações, mas não há diferenças significativas entre as outras concentrações, à excepção da concentração 0,1 mg.mL⁻¹ que mostra diferenças significativas da concentração 0,4 mg.mL⁻¹. Ou seja, este resultado permite concluir que a partir da concentração de 0,05 mg.mL⁻¹, se começam a verificar diferenças na mortalidade entre uma população suscetível (C) e uma população suspeita de resistência (B8), o que justifica a adoção deste tipo de estudos para ensaio de despiste, visto que é um ensaio simples e que permite resultados em pouco tempo (duas ou três semanas) em comparação com outro tipo de ensaios mais complexos e que podem durar vários meses, como por exemplo, o ensaio de dose-resposta com planta inteira realizado em estufa.

4.3. Ensaio de dose-resposta ao glifosato com planta inteira

Primeira ensaio

No ensaio de dose-resposta ao glifosato com planta inteira, verificou-se a 21 DAA, a presença de antocianinas (cor avermelhada) em plantas de ambas as populações sujeitas às várias doses glifosato. Foi também verificado, tanto na população R como na população S, o sintoma de epinastia, nas doses mais baixas do herbicida (1/4 N e 1/2 N).

Na Figura 8, apresentam-se as curvas de dose-resposta ao glifosato de duas populações de *Conyza bonariensis*. A análise de curvas de dose-resposta foi realizada com base nos valores dos parâmetros estimados pelo modelo logístico (Quadro 5). Na população C, suscetível (S) de referência, a dose mais elevada de glifosato (5760 g.ha⁻¹) provocou redução de peso entre 97% e 91%, relativamente à testemunha, consoante a avaliação do peso verde e do peso seco, respetivamente. O declive da curva de dose-resposta foi mais acentuado do que o apresentado para a população B8 (R), em ambos os parâmetros estudados. Na população S, o valor de $ED_{50} = 115,99$ g ha⁻¹ (peso verde) e 119,80 g ha⁻¹ (peso seco) foi inferior ao da dose-recomendada de glifosato, o que confirma tratar-se de uma espécie suscetível a este herbicida.

Para a população suspeita de resistência (B8), a dose mais elevada de glifosato (5760 g ha⁻¹) causou uma redução de peso de 100%, relativamente à testemunha e para ambos os parâmetros estudados. Nesta população, o valor de $ED_{50} = 371,08$ g ha⁻¹ (peso verde) e 396,12 g ha⁻¹ (peso seco) correspondem a doses, cerca de três vezes superiores às verificadas para a população S. Os valores de NR ($ED_{50}(R)/ED_{50}(S)$) atingiu o valor 3 para a população B8, em ambos os parâmetros, o que poderá indicar que esta população é resistente ao glifosato.

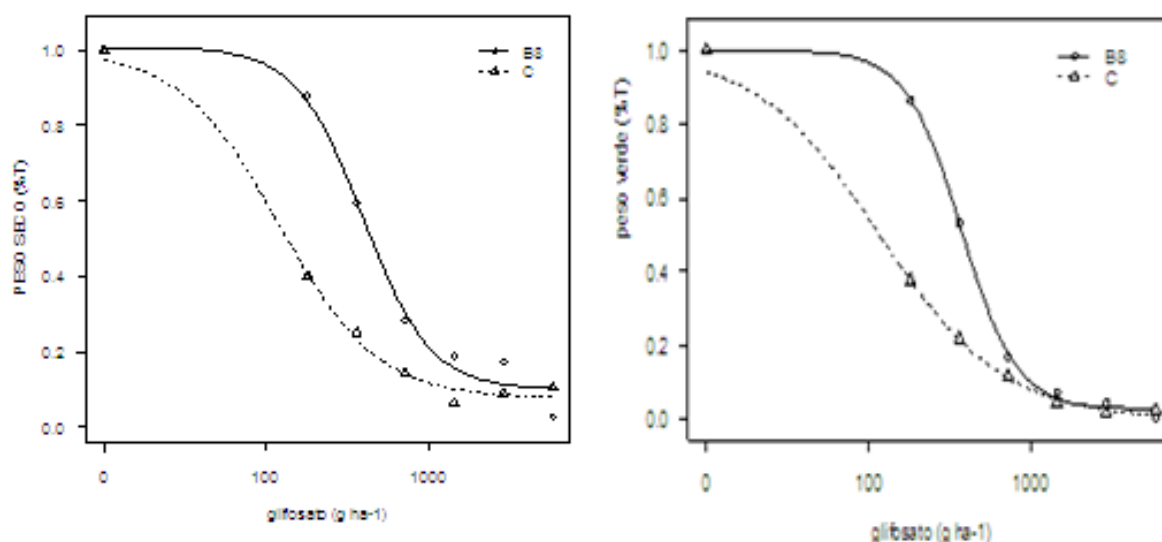


Figura 8: Curvas de dose-resposta ao glifosato de duas populações de *C. bonariensis*: B8 (suspeita de resistência) e C (suscetível usada como referência). A dose N (dose recomendada) corresponde a 720 g ha⁻¹ de glifosato (primeiro ensaio).

Quadro 5: ED_{50} e Nível de resistência para o peso verde e o peso seco (g) de duas populações de *C. bonariensis* relativos ao primeiro ensaio de glifosato.

População	ED_{50}	NR	ANOVA	Classificação
Parâmetro	(g ha ⁻¹)	$ED_{50}(R)/ED_{50}(S)$	(P)	
Peso verde				
B8	371,08	3,1992	2,76E-12	R
C	115,99	-	9,64E-20	S
Peso seco				
B8	396,12	3,30649	5,77E-10	R
C	119,80	-	2,19E-09	S

Segundo ensaio

Neste ensaio também se verificou a presença de antocianinas em ambas as populações, bem como a epinastia em plantas sujeitas às doses mais baixas de glifosato (1/4 N e 1/2 N).

Na Figura 9, apresentam-se as curvas de dose-resposta ao glifosato de duas populações de *Conyza bonariensis* obtidas no segundo ensaio. A análise de curvas de dose-resposta foi realizada com base nos valores dos parâmetros estimados pelo modelo logístico (Quadro 6). Na população C, suscetível (S) de referência, a dose mais elevada de glifosato (5760 g.ha⁻¹) provocou redução de peso entre 95% e 71%, relativamente à testemunha consoante a avaliação do peso verde e do peso seco,

respetivamente. O declive da curva de dose-resposta foi mais acentuado do que o apresentado para as populações R, em ambos os parâmetros estudados. Nesta população, verificou-se um valor de $ED_{50} = 600,08 \text{ g ha}^{-1}$ para o peso verde e de $655,15 \text{ g ha}^{-1}$ para o peso seco.

Para a população suspeita de resistência (B8), a dose mais elevada de glifosato (5760 g ha^{-1}) causou uma redução de peso de 95% e 77% relativamente à testemunha, consoante a avaliação do peso verde e do peso seco, respetivamente. para ambos os parâmetros estudados. Nesta população, o valor de $ED_{50} = 1217,48 \text{ g ha}^{-1}$ (peso verde) e $1353,85 \text{ g ha}^{-1}$ (peso seco) correspondem a doses muito superiores à recomendada de glifosato. Os valores de NR ($ED_{50} (R)/ED_{50}(S)$) atingidos de 2 para ambos os parâmetros e para a população B8, permitem confirmar que esta população é resistente ao glifosato.

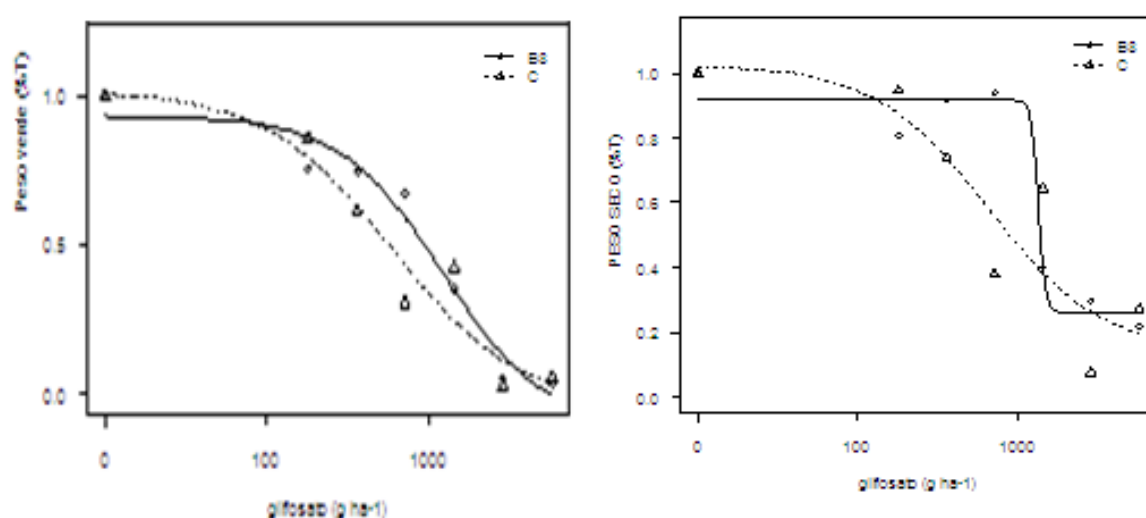


Figura 9: Curvas de dose-resposta ao glifosato de duas populações de *C. bonariensis*: B8 (suspeita de resistência) e C (suscetível usada como referência). A dose N (dose recomendada) corresponde a 720 g ha^{-1} de glifosato (segundo ensaio).

Quadro 6: ED_{50} e Nível de resistência para o peso verde e o peso seco (g) de duas populações de *C. bonariensis* relativos ao segundo ensaio de glifosato.

População	ED_{50}	NR	ANOVA	Classificação
Parâmetro	(g há-1)	$ED_{50} (R)/ED_{50}(S)$	(P)	
Peso verde				
B8	1217,48	2,02887	1,91E-10	R
C	600,08	-	6,42E-15	S
Peso seco				
B8	1353,85	2,06647	8,52E-07	R
C	655,15	-	1,81E-09	S

Os NR ao glifosato são relativamente baixos em *Conyza* spp., não atingindo valores superiores a 2 para *C. bonariensis* e entre 7 e 10 para *C. canadensis* (Leon *et al.*, 2005; Rubin, 2009). Estes valores dependem do mecanismo bioquímico responsável pela resistência. O mecanismo mais frequente em dicotiledóneas é a perda de sistemica do glifosato nas populações resistentes (Dinelli *et al.*, 2006; 2008). Recentemente foi identificado uma população de *C. sumatrensis* R ao glifosato com NR de 60. Este valor elevado está associado à ploidia e à mutação no gene que codifica a enzima alvo do glifosato EPSPS sintase (Gonzalez-Torralba *et al.*, 2011).

A análise dos dados, permite verificar diferenças nos dois ensaios de dose-resposta ao glifosato, quer nas curvas de dose-resposta do peso verde e do peso seco, quer nos valores de NR e de ED_{50} das populações B8 e C em ambos os parâmetros. Pode haver numerosos fatores, que é necessário controlar com rigor, e que podem ter contribuído para essas diferenças, tais como a temperatura e iluminação da estufa, o substrato, a rega e a solução nutritiva ou a técnica de aplicação. Como se pode constatar pelo valor de P ($<0,05$) em ambos os ensaios e para ambas as populações, verificam-se diferenças significativas entre as doses aplicadas, isto é, diferentes doses apresentam diferentes efeitos nas plantas de ambas as populações.

Para se obterem conclusões mais indicativas, é necessário efetuar uma análise em série, ou seja, efectuar o estudo através da utilização dos dados de vários ensaios, no sentido de confirmar se a resposta à dose (o valor de ED_{50}) depende do ensaio.

4.4. Ensaio de dose-resposta ao flazasulfurão com planta inteira

Primeiro ensaio

Na Figura 10 apresentam-se as curvas de dose-resposta ao flazasulfurão de duas populações de *Conyza bonariensis*. No ensaio de dose-resposta ao flazasulfurão, não foi possível ajustar o modelo não linear do tipo logístico nem obter valores de ED_{50} para determinar o nível de resistência (NR).

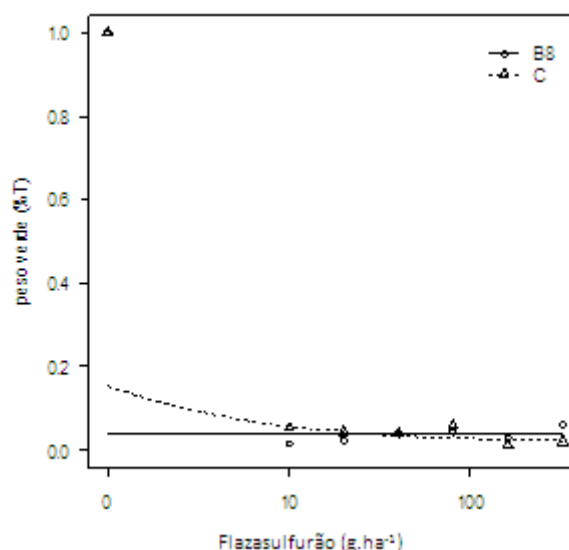


Figura 10: Curvas de dose-resposta ao flazasulfurão de duas populações de *C. bonariensis*: B8 e C. A dose N (dose recomendada) corresponde a 40 g ha⁻¹ de flazasulfurão.

Através da análise de variância (ANOVA) para ambas as populações verificaram-se diferenças significativas entre as doses aplicadas, ou seja, diferentes doses provocam diferentes efeitos nas plantas de ambas as populações.

A ausência de conclusões mais específicas, deve-se à utilização de doses muito elevadas de soluções herbicidas que acabaram por causar uma mortalidade muito elevada de ambas as populações, não permitindo calcular o ED_{50} . Assim sendo, dever-se-ia utilizar doses mais baixas para poder obter resultados.

No entanto, verificou-se que ambas as populações se mostraram muito susceptíveis à aplicação deste herbicida.

4.5. Ensaio de determinação de shiquimato

O estudo relativo à análise de acumulação de shiquimato foi efectuado para uma população suscetível (C) e outra resistente (B8) de *Conyza bonariensis* para comparar o comportamento das plantas, relativamente à acumulação de shiquimato. Foi também relacionada a acumulação de shiquimato em plantas não tratadas com glifosato (Testemunha das populações indicadas) com a das plantas tratadas. Estas populações mostraram um comportamento diferente a 0; 1 e 2 DAA, mas semelhante a 3 DAA, onde se verificou um decréscimo da concentração de shiquimato em ambas (Figura 11).

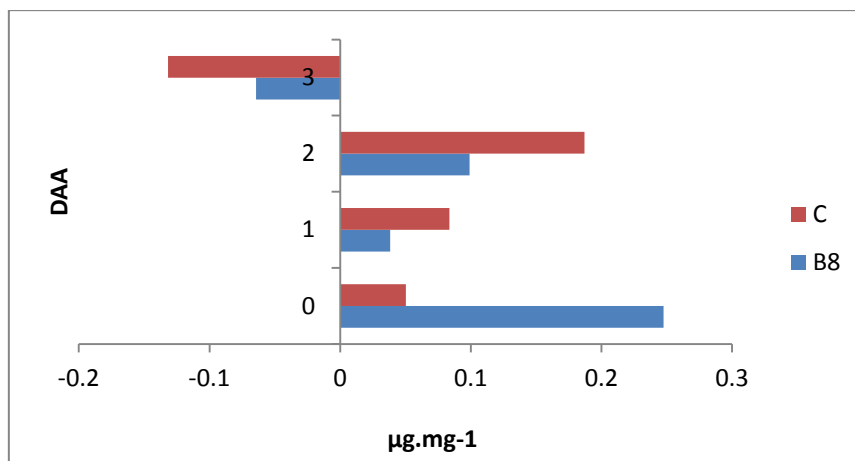


Figura 11: Acumulação de shiquimato endógeno em duas populações de *C. bonariensis*: B8 (R) e C (S) em plantas testemunha. 1-24h; 2-48h; 3-72h após aplicação de glifosato.

Quanto às plantas tratadas, verificou-se maior acumulação de shiquimato para concentrações mais elevadas e verificou-se também a sua contínua acumulação ao longo do tempo, para as populações B8 (R) e C (S). No último dia do ensaio (3 DAA) não se verificaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre a população suscetível (C) e a população suspeita de resistência (B8), o que está de acordo com um estudo feito por Dienelli *et al.*, (2008) que não verificou diferenças significativas a 3 DAA nos níveis de shiquimato entre as populações S e R de *C. bonariensis*.

O comportamento das populações B8 e C, relativamente à acumulação de shiquimato foi idêntica, ou seja, em ambas se verificou o aumento de shiquimato ao longo do tempo e em ambas as modalidades, com exceção da população C na modalidade 0,5 N (360 g ha^{-1}) que diminuiu a concentração de shiquimato das 24h para as 48h, verificando-se posteriormente um aumento das 48h para as 72h (Figura 12).

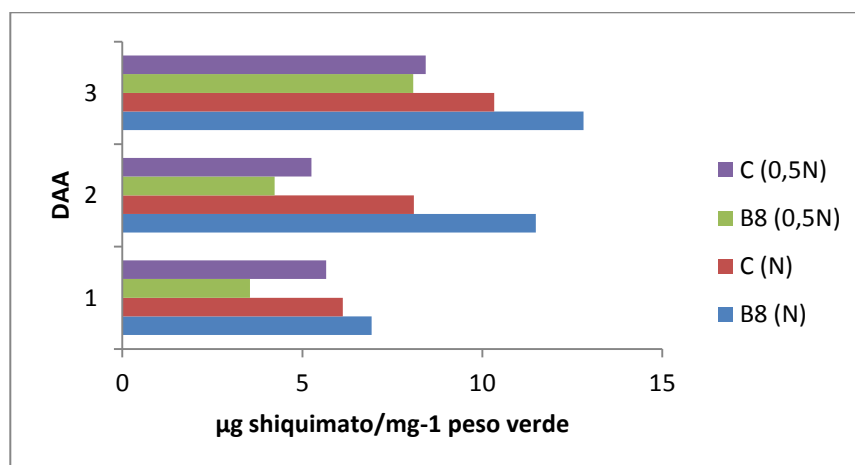


Figura 12: Acumulação de shiquimato endógeno em duas populações de *C. bonariensis*: B8 (R) e C (S). 1-24h; 2-48h; 3-72h após aplicação; 0,5N-360 g.ha⁻¹; N-720 g.ha⁻¹.

Se o mecanismo de resistência ao glifosato das populações de *Conyza bonariensis* em estudo, fosse a insensibilização da enzima EPSPS, seria de esperar que a população resistente (B8) apresentasse menor acumulação de shiquimato do que a população suscetível (C). O glifosato atua inibindo a ação da enzima EPSPS, logo plantas menos afetadas, implicariam menor acumulação de shiquimato. Com base em estudos feitos em culturas resistentes ao glifosato, a acumulação de shiquimato em populações resistentes seria inesperada (Pline *et al.*, 2002).

Segundo Meller *et al.* 2003, o mecanismo de resistência de *Conyza* spp. não é apenas devido à inibição da enzima EPSPS, porque se assim fosse não se verificaria uma acumulação significativa de shiquimato. Os mesmos autores sugerem uma hipótese para este fenómeno, sendo a existência de múltiplos genes codificando várias isoformas de EPSPS responsáveis por níveis variáveis de inibição causada pelo glifosato. Os mesmos autores sugerem que a população resistente ao glifosato pode acumular shiquimato até 4 DAA, a partir do qual a sua concentração diminui permitindo que as plantas sobrevivam e continuem o seu desenvolvimento.

Dinelli *et al.* (2008), verificaram que a concentração de shiquimato em 4 populações R de *C. bonariensis*, aumentou constantemente até 7 DAA e começou a diminuir, apenas a partir deste dia, enquanto na população S se continuou a verificar a acumulação de shiquimato. Wakelin e Preston (2006) também obtiveram resultados idênticos em *Lolium rigidum*. Verificaram a acumulação de ácido shiquímico a 1 DAA e constatarem diferenças significativas entre populações a 4 DAA. Estes autores indicam que a população S continuou a acumular shiquimato a 7 DAA, enquanto a população R começou a diminuir a sua concentração a partir deste dia.

As conclusões deste ensaio não estão de acordo com os resultados de outros autores referidos na bibliografia, visto que a acumulação de shiquimato foi analisada, apenas até 3 DAA. Assim sendo, em estudos futuros, sugere-se a continuação desta análise durante maior período de tempo.

V. Conclusão

Os estudos realizados permitiram a obtenção de resultados que indicam a possível resistência ao glifosato de uma população de *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. (avoadinha-peluda) proveniente de um pomar de citrinos do Alentejo. O fator de resistência obtido nos ensaios de dose-resposta foi de 2-3, o que indica que esta população (B8) é duas a três vezes menos sensível à aplicação de glifosato do que a população suscetível de referência (C).

Os métodos utilizados para confirmar a resistência ao glifosato foram os seguintes: ensaio de dose-resposta com planta inteira realizado em estufa, cujo peso seco foi o parâmetro que apresentou resultados mais fiáveis; ensaio de determinação do shiquimato e ensaio de dose resposta ao glifosato em Placa de Petri. Foi também estudada a capacidade germinativa das populações em estudo, através de um ensaio de germinação, que permitiu perceber que as sementes de *Conyza bonariensis* com um ano, conservadas a 4°C, na obscuridade, mantiveram a sua viabilidade, para além de evidenciar que houve diferenças significativas na germinação de duas populações com diferente suscetibilidade ao glifosato.

Os estudos realizados em placa de Petri permitiram determinar a concentração e o parâmetro discriminatórios para *Conyza bonariensis* R ao glifosato, respetivamente 0,5 mM e mortalidade das plântulas (clorose dos cotilédones) ao fim de 17 DAA. Este método permitiu confirmar a R ao glifosato em menor tempo e apresentou sensibilidade idêntica ao ensaio com planta inteira em vaso, sugerindo que é uma alternativa mais simples e que permite conclusões num espaço de tempo mais curto.

O método do shiquimato foi validado para plantas susceptíveis ao glifosato, da espécie *Conyza bonariensis*. O ensaio não permitiu determinar diferenças na acumulação de shiquimato ao longo do tempo (24-h, 48-h e 72-h) entre as populações de *C. bonariensis* R e S ao glifosato. Propõe-se que, em estudos futuros, a determinação do shiquimato seja realizada ao longo de um período de tempo mais alargado.

O flazasulfurão, herbicida pertencente à família química das sulfonilureias (MOA - B: inibição da ALS) poderá constituir uma alternativa ao glifosato no controlo de populações resistentes, sendo no entanto, necessário continuar e desenvolver este tipo de estudos para aprofundar esta questão. Salienta-se que este herbicida não está autorizado para citrinos em Portugal. Embora possa ser utilizado noutras culturas perenes, designadamente olival e vinha.

Em síntese, a população B8 mostrou ter maior capacidade germinativa do que a população C e ser mais resistente à aplicação de glifosato, quer em estado de semente, quer em estado de roseta.

A maior taxa germinativa associada a uma população resistente, sugere que o agricultor deveria conseguir controlar estas populações com maior eficácia, através da utilização de herbicidas com diferentes modos de ação e de práticas culturais.

Referências Bibliográficas

- Alexander, M. (1961). Introduction to soil microbiology. *Nova York: John Wiley and Sons*, 472 p.
- Amrhein, N., Johanning, D., Schab, J., Schulz, A. (1983). Biochemical basis for glyphosate tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. *FEBS*, 157-191.
- Andersen, M.C. (1993). Diaspore morphology and seed dispersal in several wind-dispersed Asteraceae. *American Journal of Botany* 80, 487-492.
- Bailey, C. W., White, J. L. (1970) Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soil. Residue review the triazine herbicides. *New York: Springer Verlag* 32, 29-92.
- Baskin, C. C., Baskin, J. M. (1998) Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. *San Diego: Academic Press*, 666 p.
- Baur, J.R. (1979). Effect of glyphosate on auxin transport in corn and cotton tissues. *Plant Physiology* 63, 882-886.
- Beckie, H.J. (2006). Herbicide-Resistant weeds: management tactics and practices. *Weed Technology* 20, 793-814.
- Bertrand, C. (2003). Flazasulfuron alcoholysis, chemical hydrolysis, and degradation on various minerals. *J. Agric. Food Chemistry*, 51, 7717-7721.
- Bewley, J. D., Black, M. (1994). *Seeds: physiology of development and germination*. 2.ed. *New York: Plenum*, 445 p.
- Bhowmik, P. C., Bekech, M. M. (1993). Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence and distribution in no-tillage and conventional-tillage corn (*Zea mays*). *Agronomy* 1, 67-71.
- Biederbeck, V. O., Campbell, C. A., Hunter, H. J. (1997). Tillage effects on soil microbial and biochemical characteristics in a fallow-wheat rotation in a dark brown soil. *Canadá. Journal Soil Science. Guelph*, 77, 309-16.
- Blair, A. M., Martin, T. D. (1988). A review of the activity fate and mode of action of sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science*, 22, 195-219.
- Boerboom, C.M. (1999). Non-chemical options for delaying weed resistance to herbicides in Midwest cropping systems. *Weed Technology*, 13, 636-642.
- Bourgeois, L., Kenkel, N.C., Morrison, I.N. (1997). Characterization of cross-resistance patterns in acetyl-CoA carboxylase inhibitor resistant wild oat (*Avena fatua*). *Weed Science*, 45, 750-755.

- Bracamonte, E.R., Novo, R.J., Rinderstma, L. (2001). Impacto de la soja (*Glycine max* (L.) Merrill) transgénica em el perfil productivo agrícola en Argentina. *Simposium Internacional Córdoba*, 619-625.
- Bradshaw, L.D., Padgett, S.R., Kimball, S.L., Wells, B.H. (1997) Perspective of glyphosate resistance. *Weed Technology*, 11, 189- 198.
- Bronstad, J. O., Friestad, H. O. (1985). The herbicide glyphosate. *Londres, Butterworth*. 200 p.
- Brown, H. M. (1990). Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science, Sussex*, 29, 263-281.
- Brown, S. M., Whitwell, T. (1988). Influence of tillage on horseweed, *Conyza canadensis*. *Weed Tehnology* 2, 269-270.
- Bruce, J.A., Kells, J.J. (1990). Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides. *Weed Technology, Champaign* 4, 642-647.
- Buckley, D. H., Schmidt, T. M. (2001). The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbiology Ecology. Nova York* 42, 11-21.
- Buhler, D.D., Owen, M.D.K. (1974). Emergence and survival of horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science, Lawrence* 45, 98-101.
- Burkart, A. (1974). Flora Ilustrada de Entre Rio (Argentina) Parte VI: Dicotiledoneas Metaclamídeas (Gamopétalas), B: Rubiales, Cucurbitales, Campanulales (incluso Compuestas). *Buenos Aires*, 554 p.
- Calha, I. Moreira, I. e Rocha, F. (2008) Germinação de sementes de populações de orelha-de-mula (*Alisma plantago-aquatica*) resistentes e susceptíveis ao bensulfurão-metilo. *Revista de Ciências Agrárias* 31(1), 117-130.
- Calha, I. M., Osuna, M. D. (2010). Herbicide weed resistance in portuguese olive groves. AFPP – INRB/LINIA.
- Cardoso, V. J. M. (2004). Germinação. *Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 386-408.
- Carvalho, N. M., Nakagawa, J. (2000). Sementes: ciência, tecnologia e produção. *Campinas: Fundação Cargill*. 588 p.
- Chachalis, D., Reddy, K. N. (2000). Fators affecting *Campisradicans* seed germination and seedling emergence. *Weed Science*. 48, 212-216.
- Christoffoleti, P.J. (1992). Growth, competitive ability, and fitness of sulfonylurea resistant and susceptible biotypes. 198 p.

Christoffoleti, P.J. (1993). Growth competitive ability, and fitness of sulfonylurea resistant and susceptible . *Fort Collins*. 198 p.

Christoffoleti, P.J., Victoria Filho, R., Silva, C.B. (1994). Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. *Planta Daninha* 12, 13-20.

Christoffoleti, P.J. (1997). Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. Dourados: EMBRAPA, 75-94.

Christoffoleti, P.J., Medeiros, D., Monqueiro, P.A., Passini, T. (2000). Plantas daninhas à cultura da soja: controle químico e resistência a herbicidas. *Piracicaba: ESALQ*, 179-202.

Christoffoleti, P.J., Mendonça, C.G. (2001). Controle de plantas daninhas na cultura de milho: enfoque atual. *Piracicaba: ESALQ*, 60-95.

Christoffoleti, P.J. (2001). Análise comparativa do crescimento de populações de picão-preto (*Bidens pilosa*) resistente e suscetível aos herbicidas inibidores da ALS. *Planta Daninha* 19, 75-83.

Christoffoleti, P. J. (2004). Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2 ed. *Campinas: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos herbicidas (HRAC)*, 100 p.

Christoffoleti, P.J., López-Ovejero, R. F. (2005). Dinâmica dos herbicidas aplicados na cultura da cana-de-açúcar. *São Paulo: BASF*, 49 p.

Christoffoleti, P.J. (2008). Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas. *Piracicaba: ESALQ*, 14-119.

Cole, D. J. (1985). Mode of action of glyphosate – a literature analysis. *The herbicide glyphosate, Londres: Butterworths* 49-54.

Coupland, D., Peabody, D. V. (1981). Absorption, translocation, and exudation of Glyphosate, Fosamine and Amitrole in Field Horsetail (*Equisetum arvense*). *Weed Science. Champaign* 29, 556-60.

Cussan, G.W., Moss, S.R. (1982). Population dynamics of annual grass weeds. British Crop Protection Symposium: Decision making in the practice of crop protection, Croydon. *Croydon: British Crop Protection Council*, 91-98.

Devine, M., Duke, S.O., Fedtke, C. (1993). Inhibition of amino acid biosynthesis. *Physiology of herbicide action* 13, 251-294.

Devine, M., Duke, S. O., and Fedtke, C. (1993). Physiology of Herbicide Action. *Englewood Cliffs, NJ: PTR Prentice-Hall*, 96 p.

Dick, R.E., Quinn, J.P. (1995). Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology Biotechnology* 43, 545-550.

Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Catizone, P., Urbano, J. M., Barnes, J. (2008). Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain. *Weed research* 48, 257-265.

Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P. e Barnes, J. (2006) - Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86, 30–41.

Duggleby, R.G., Pang, S.S. (2000). Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 33, 1-36.

Duke, S. O., Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64, 319-325.

Duke, S. O. (2011). Glyphosate Degradation in Glyphosate-Resistant and -Susceptible Crops and Weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 5835–5841.

Dyer, W.E. (1994). Resistance to glyphosate. *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry*. Boca Raton, FL: Lewis, 229–242.

Egley, G.H., Williams, R.D. (1991). Emergence and periodicity of six summer annual weed species. *Weed Science* 39, 595-600.

Felding, G. (1997). Pesticide adsorption as a function of depth below surface. *Pesticide Science*. 50, 64-66.

Feng, J. C., Thompson, D. G., Reynolds, P. E. (1990). Fate of Glyphosate in a Canadian Forest Watershed. *Aquatic Residues and Off Target Deposit Assessment*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington 38, 1110 p.

Fenner, M. (1983). Relationships between seed weight, ash content and seedling growth in twenty-four species of Compositae. *New Phytologist*, New York 95, 697-706.

Ferreira, A. F., Silva, A. A., Ferreira, L. R. (2005). Mecanismos de Ação a Herbicidas.

Franco J. A. (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Vol. II Lisboa

Frankland, B., Taylorson, R. (1983). Light control of seed germination. *Photo morphogenesis*. Berlin: Springer-Verlag, 428-456.

Franz, J.E. (1985). Discovery, development and chemistry of glyphosate. *The herbicide glyphosate*. London: ButterworthseCo. Ltda., 3-17.

Gadamski, G., Ciarka, D., Gressel, J.; Gawronski, S.W. (2000). Negative cross resistance in triazine resistant biotypes of *Echinochloa crus-galli* and *Conyza Canadensis*. *Weed Science* 48. 176-180.

Galli, A. J. B. and Montezuma, M. C. (2005). Glifosato: Alguns aspectos da utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura. *ACADCOM*. 12-49.

Gazziero, D.L.P., Brighenti, A.M., Maciel, C.D.G., Christoffoleti, P.J., Adegas, F.S., Voll, E. (1998). Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. *Planta Daninha* 16, 117-125.

Ghassemi, M., Fargo, L., Painter, P., Quinlivan, S., Scofield, R., Takata, A. (1981). Environmental fates and impacts of major forest use pesticides. *Washington: U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances*, 149 p.

Geiger, D. R., Fuchs, M. A. (2002). Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate). *Herbicide classes in development*. Berlin: Springer-Verlag, 59-85.

Giesy, J. P., Dobson, S., Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. *Rev. Environment Contamination Toxicology., Nova York* 167, 35-120.

Gomez, M. A., Perez, M. T., Sagardoy, M. A. (1989). Effect of successive applications of glyphosate on the aerobic bacteria and microarthropods of a sandy soil. *Cience Suelo, Buenos Aires* 7, 55-61.

Gomez, M. A., Sagardoy, M. A. (1985). Influence of glyphosate herbicide on the microflora and mesofauna of a sandy soil in the semiarid region. *Review Latinoamerican Microbiology. México* 27, 351 p.

Gonzalez, J. M., Ukrainczyk, L. (1996). Adsorption and desorption of nicosulfuron in soils. *Journal Environment Quality*. 25, 186-1192.

GÓRSKI, T. (1975). Germination of seeds in the shadow of plants. *Physiologia Plantarum, Copenhagen* 34, 342-346.

Gressel, J., Segel, L.A. (1990). Modeling the effectiveness of herbicide rotation and mixtures strategies to delay or preclude resistance. *Weed Technology* 4, 186-198.

Grossbard, E. (1985). Effects of glyphosate on the microflora: with reference to the decomposition of treated vegetation and interaction with some plant pathogens. *The herbicide glyphosate*, 159 p.

Grossbard, E., Harris, D. (1979). Effects of herbicides on the decay of straw. *Straw decay and its effect on disposal and utilization*. John Wiley and Sons, Chichester, UK, 167-176.

Gruys, K.J., Sikorski, A. (1999). Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides. *Plant amino acids - biochemistry and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc., 357-365.

Guimarães, S. C., Souza, I. F., Pinho, E. V. R. (2000). Efeito de temperaturas sobre a germinação de sementes de erva-de-touro (*Tridax procumbens*). *Planta Daninha* 18, 457-464.

Haderlie, L.C., Slife, F.W., Butler, H.S. (1978). ¹⁴C-glyphosate absorption and translocation in maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) seeds and in soybean plants. *Weed Research* 18, 269-273.

Haney, R. L., Senseman, S. A., Hons, F. M. (2002). Effect of Roundup Ultra on microbial activity and biomass from selected soils. *Journal Environment Quality*, Madison 31, 730 p.

Haney, R. L., Senseman, S. A., Hons, F. M., Zuberer, D. A. (2000). Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*. Champaign 48, 89-93.

Hanf, M. (1988). The arable weeds of Europe with their seedlings and seeds. *Ludwigshafen: BASF Aktiengesellschaft*, 494 p.

Harper, S. S. (1988). Sorption of metribuzin in surface and subsurface soils of the Mississippi Delta Region. *Weed Science*. 36, 84-89.

Hart, M. R., Brookes, P. C. (1996). Soil microbial biomass and mineralization of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. *Soil Biology Biochemistry*. Exeter 28, 1641-9.

Hay J. V. (1990). Chemistry of sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science*. 29, 247-261.

Heap, I. (2005). The international survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org/in.asp>

Heap, I. M. (2012). International Survey of Herbicide-Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org>

Hess, M., Barralis, G., Bleiholder, L., Buhr, Eggers, T. , Hack, H., Stauss, R. (1997). Use of the extended BBCH scale – general for the description of the growth stages of mono- and dicotyledonous weed species. *Weed Research* 37 (6). 433-432.

Holt, J.S., Le Baron, H.M. (1990). Significance and distribution of herbicide resistance. *Weed Technology*. 4, 141-149.

Jansen, A. E. (1999). Impacto ambiental del uso de herbicidas en siembra directa: proyecto conservación de suelos. *San Lorenzo*.

Jasieniuk, M., Brule-Babel, A. L. , Morrison, I. M. (1996). The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science* 44, 176-193.

Jaworski, E.G. (1972). Mode of action of N-phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20. 1195-1198.

Kirkwood, R. C. (1979). Advance in pesticide science. *Oxford: Pergamon Press*, 420-429.

Kishore, G. M., Shah, D. M. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annual Reviews of Biochemistry* 57, 627-663.

Kissmann, K.G., Groth, D. (1999). Plantas infestantes e nocivas. 2.ed. *São Bernardo do Campo: Basf*. 152-156, 278-284.

Kissmann, K.G. (2003). Resistência de plantas daninhas a herbicidas. http://www.hrac-br.com.br/arquivos/texto_resistencia_herbicidas

Knezevic, S. Z., Streibig, J. C., e RITZ, C (2007). Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and DAAa analysis. *Weed technology* 21, 840-848

Koger, C. H., Reddy, K. N., Poston, D. H. (2004). Factors affecting seed germination, seedling emergence, and survival of texasweed (*Capteroniapalustris*). *Weed Science*. 52, 989-995.

Koger, C.H., Reddy, K.N. (2005). Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science, Lawrence* 53, 84-89.

Kollman, W., Segawa, R. (1995). Interim report of the pesticide chemistry Data base: environmental hazards assessment program. *Department of Pesticide Regulation*.

Koskinen, W. C., Harper, S. S. (1990). The retention process: mechanisms. Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling. *Madison: Soil Science Society of America*. 51-77.

Lamego, F. P., Vidal, R.A. (2007). Resistência ao glyphosate em populações de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Planta Daninha* 25.

Lazaroto, C. A., Fleck, N. G., Vidal, R. A. (2008). Biologia e ecofisiologia de buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*). *Ciencia Rural* 38.

Leitão Filho, F. H. (1972). Plantas Invasoras de Culturas. São Paulo, v. 2, HUCITEC: Ministério da Agricultura, Agiplan, Banco Interamericano de Desenvolvimento. 362p.

Liu, C. M., Mclean, P. A., Sookdeo, C. C., Cannon, F. C. (1991). Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington 57, 1799 p.

Lopes, Amélia M. V.; Álvares, F. A. (1996). EXE: Plantas Medicinais. Nossas Farmácias Vivas. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria.

López-Ovejero, R.F., Christoffoleti, P.J., Nicolai, M, Barela, J.F. (2003). Manejo de plantas daninhas na cultura do milho. *Milho: estratégias de manejo para alta produtividade. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV*, 47-79.

López-Ovejero, R.F., Christoffoleti, P.J., Vargas, L. (2004). Resistência de plantas daninhas a herbicidas. *Manual de manejo e controle de plantas daninhas. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho*, 185-214.

López-Ovejero, R. F., Carvalho, S. J. P.; Nicolai, M., Abreu, A.G., Grombone-Guaratini, M.T., Toledo, R. E. B., Christoffoleti, P.J. (2006). Resistance and differential susceptibility of *Bidens pilosa* and *B. subalternans* biotypes to ALS inhibiting herbicides. *Scientia Agricola* 63, 139-145.

Lorenzi, H, Matos, F. J. A. (2000). Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. São Paulo: Nova Odessa, Ed. Instituto Plantarum, 608 p.

Lorenzi, H. (2006). Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 339 p.

Lydon, J., Duke, S. O. (1989). Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. *Pesticide Science* 25, 361-373.

Madsen, K.H., Jensen, J. E. (1998). Meeting and training on risk analysis of HRCS and exotic plants. *Piracicaba: ESALQ-USP*.

Mallory Smith, C. A., Thill, D. C., Dial, M. J. (1990). Identification of sulfonylurea herbicide resistant prickly lettuce (*Lactuca seriola*). *Weed Technology* 4, 787-790.

- Marcos Filho, J. (2005). Germinação. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, 197-252.
- Marks, M. K., Akosim, C. (1984). Achene dimorphism and germination in three composite weeds. *Trop. Agr.* 61, 69-73.
- Martins, B. A. (2008). Biologia e manejo da planta daninha *Borreria densiflora*. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 169 p.
- Matiello, R. R., Ronzelli Júnior, P., Puríssimo, C. (1999). Mecanismos de resistência: fatores biológicos, agrônômicos e genéticos. *Ponta Grossa. AEACG*, 27-40.
- Mayer, A. M., Poljakoff-Mayber, A. (1989) The germination of seeds. Oxford: Pergamon Press, 270 p.
- Mendes, S., Portugal, J., Calha, I. M. (2011). Prospecção de resistência ao glifosato em populações de *Conyza canadensis*. IPB/INRB I.P.
- Mersie, W., Foy, C. L. (1985). Phytotoxicity and adsorption of chlorsulfuron as affected by soil properties. *Weed Science*. 33, 564-568.
- Moreira, M.S., Melo, M.S.C., Carvalho, S.J.P., Nicolai, M. (2010). Herbicidas Alternativos Para Controle de Populações de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* Resistentes ao Glyphosate. *Planta Daninha. Viçosa-MG*. 28, 167-175.
- Mortimer, A. M., Hill, J. E. (1999). Weed species shifts in response to broad spectrum herbicides in sub-tropical and tropical crops. *The 1999 Brighton Conference, Brighton. Brighton: British Crop Protection Council* 11, 425-436.
- Mueller, T.C. (2003). Shikimate accumulates in both glyphosate-sensitive and glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington* 51, 680-684.
- Mueller, T. C., Massey, J. H., Hayes, R. M., Main, C. L., Stewart, C. N. (2003). Shikimate Accumulates in Both Glyphosate-Sensitive and Glyphosate-Resistant Horseweed (*Conyza Canadensis* L. Cronq.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 680-684.
- Nandula, V. K. (2006). Factors affecting germination of horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*. 54, 898-902.
- Nandula, V. J. (2010). Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development and Management. *Wiley*, 35-42.

Neve, P., Diggle, A.J., Smith, F.P., Powles, S.B. (2003). Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*, past, present and future glyphosate use in Australian cropping. *Weed Research*, 43, 418- 427.

Nicolai, M; Carvalho, S. J. P., López-Ovejero, R.F., Christoffoleti, P.J. (2006). Aplicação conjunta de herbicidas e inseticidas na cultura do milho. *Bragantia* 65, 413-420.

O'Donovan, J. T., Newman, J. C., Blackshaw, R. E., Harker, K. N., Derksen, D. A., Thomas, A. G. (1999). Growth, competitiveness, and seed germination of triallate/difenzoquat-susceptible and - resistant wild oat populations. *Canadian Journal of Plant Science* 79(2), 303-312.

Oliveira J. R. (2001). Seletividade de herbicidas para culturas e plantas daninhas. *Plantas daninhas e seu manejo. Guaíba Agropecuária*, 291-314.

Oliveira, M. F., Prates, H.T., Sans, L.M.A. (2005). Sorção e hidrólise do herbicida flazasulfuron. *Plantadaninha* 23.

Olsen, J. R., Harper, J. K., Curran, W. S. (1996). Selecting cost-minimizing herbicide programs for corn (*Zea mays*). *Weed Technology* 10, 327-336.

Owen, M. D. K. 2001 Importance of weed population shifts and herbicide resistance in the Midwest USA corn belt. In *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Weeds*. Farnham, UK: British Crop Protection Council, 407-412.

Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X. (1995). Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Science* 35, 1451-1461.

Peterson, C.A., De Wildt, P.P.O., Edgington, C.V. (1978). A rationale for the ambimobile translocation of the nematodeoxyamyl in plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 8, 1-9.

Peterson, D.E. (1999). The impact of herbicide-resistant weeds on Kansas agriculture. *Weed Technology* 13, 632-635.

Pipke, R., Schulz, A., Amrhein, N. (1987). Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington 53, 974 p.

Pitelli, R. A. (2004). Ecologia e manejo de plantas daninhas em cana-crua. *Jaboticabal: Unesp*.

Pline-Srnic, W. (2006). Physiological mechanisms of glyphosate resistance. *Weed Technology* 20, 290-300.

- Pline, W. A., Wilcut, J. W., Duke, S. O., Edmisten, K. L., Wells, R. (2002). Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 506-512.
- Powles, S. B., Holtum, J. A. M. (1994). Herbicide resistance in plants: Biology and biochemistry. *Boca Raton*.
- Powles, S. B., Lorraine-Colwill, D. F., Dellow, J. J., and Preston, C. (1998). Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Weed Science* 16, 604-607.
- Powles, S.B., Preston, C., Bryan, J.B., Jutsum, A.R. (1997). Herbicide resistance: impact and management. *Advances in Agronomy* 58, 57-93.
- Powles, S.B., Preston, C. (2006). Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance. *Weed Technology* 20.
- Prata, F., Cardinali, V. C. B., Lavorenti, A., Tornisielo, V. L., Regitano, J. B. (2003). Glyphosate sorption and desorption in soils with different phosphorous levels. *Sci. Agríc., Piracicaba* 60, 175-80.
- Prata, F. (2002). Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina. *Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba*. 149 p.
- Prata, F., Lavorenti, A., Regitano, J.B., Tornisielo, V.L. (2000). Influência da matéria orgânica na sorção e desorção do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 24, 947-951.
- Pratley, J., P. Baines, P. Eberbach, M. Incerti, and J. Broster. (1996). Glyphosate resistance in annual ryegrass. In J. Virgona and D. Michalk, eds. *Proceedings of the 11th Annual Conference of the Grasslands Society of New South Wales*. WaggaWagga, Australia: Grasslands Society of NSW. 122 p.
- Priminiani, M.M., Cotterman, J.C., Saari, L.L. (1990). Resistance of sulfonylurea and imidazolinone herbicide. *Weed Technology* 4, 169-172.
- Pyon, J.Y. (2004). Differential levels of antioxidants in paraquat – resistant and –susceptible *Erigeron canadensis* biotypes in Korea. *Weed Biology and Management* 4, 75-80.
- Quinn, J.P. (1993). Interactions of the herbicides glyphosate and glufosinate (phosphinothricin) with the soil microflora. *Boca Raton*, 245-265.
- Quinn, J. P., Pedem, J. M. M., Dick, R. E. (1988). Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 511.

Regehr, D.L., Bazzaz, F.A. (1979). The population dynamics of *Erigeron canadensis*, a successional winter annual. *Journal of Ecology, Oxford* 67, 923-933.

Rocha, F. (1996): Nomes vulgares de plantas existentes em Portugal. *Protecção da Produção Agrícola*. MADRP, DGPC. 591 p.

Rodrigues, B. N., Almeida, F. S. (2005). Guia de herbicidas. 5. Ed. Londrina: *Edição dos autores*, 592 p.

Rodrigues, J. D. (1994). Absorção, translocação e modo de ação de defensivos (glifosato e alachlor).

Rodrigues, J. J. V. (1979). Exudation of Glyphosate from treated vegetation and its implication in increasing yields in No-Till corn and soybeans. *Tese de doutorado. North Carolina State University*, 110 p.

Rodrigues, J.J.V., Worsham, D. Corbin, F.T. (1982). Exudation of glyphosate from wheat (*Triticum aestivum*) plants and its effects on interplanted corn (*Zeamays*) and soybeans (*Glycine max*). *Weed Science* 30, 316-320.

Rollin, M.J., TAN, D. (2004). Fleabane: first report of glyphosate resistant flax-leaf fleabane from western Darling Downs.

Roslycky, E. B. (1982). Glyphosate and the response of the soil microbiota. *Soil Biology Biochemistry*. 14, 87-92.

Salmazo, P. B. (2009). Efeitos de subdoses de sulfoniluréias na produtividade e qualidade de tubérculos de batatas (*Solanum tuberosum* L.). *ESALQ/USP. Piracicaba*.

Sammons, R.D.; Gruys, K.J.; Anderson, J. K. S.; Johnson, K.A.; Sikorski, J. A. (1995). Reevaluating Glyphosate as a Transition-State Inhibitor of EPSP Synthase: Identification of an EPSP Synthase-EPSP. *Glyphosate Ternary Complex. Biochemistry* 34, 6433-6440.

Sathasivan, K.; Haughn, G.W.; Murai, N. (1990). Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone-resistant *Arabidopsis thaliana* var. *Columbia*. *Nucleic Acids Res* 18, 2188.

Schonfeld, M.; Yaacoby, T.; Michael, O.; Rubim, B. (1987). Triazine resistance without reduced vigour in *Phalaris paradoxa*. *Plant Physiology* 83, 329-333.

Seefeldt, S.S.; Jensen, J.E. e Fuerst, E.P. (1995). Log-logistic analysis of dose-response relationships. *Weed Technology* 9, 218-227.

Shaner, D. L. (1991). Mechanisms of resistance to acetolactate synthase/acetohydroxyacid synthase inhibitors. *Butterworth-Heinemann*, 27-43.

Sharma, B. M. (1987). Preliminary ecological studies on lithophytes and chasmophytes in South-West Nigeria. *The Mal. For.* 50, 391-402.

Shea, P. J. (1986). Chlorsulfuron dissociation and adsorption on selected adsorbents and soils. *Weed Science*. 34, 474-478.

Sikorski, J.A.; Gruys, K.J. (1997). Understanding Glyphosate's molecular mode of action with EPSP synthase: evidence favoring an allosteric inhibitor model. *Acc. Chem. Res.* 30, 2-8.

Sixto, H., Escorial, C., Garcia-Baudin, J. M. e Chueca, M. C. (1997). Efecto del herbicida glifosato sobre la germinación de semillas de cereales método rápido de seleccion. *Actas do Congreso 1997 de la SEMh*: 93-96

Smisek, A.J.J. (1995). The evolution of resistance to paraquat in populations of *Erigeron canadensis* L. *University of Western Ontario, London, Ontario*.

Smith, A. E.; Aubin, A. J. (1993). Degradation of [¹⁴C] amidosulfuron in aqueous buffers and in an acidic soil. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*. 41, 2400-2403.

Smith, A. E. (1995). Review of analytical methods for sulfonylurea herbicides in soil. *Journal Environmental Analysis Chemistry*. 59, 97-106.

Smith, M.; Moss, J.S. (1998). An experimental investigation, using stomatal conductance and fluorescence, of the flood sensitivity of *Boltonia decurrens* and its competitors. *Journal of Applied Ecology, Oxford*. 35, 553-561.

Sprankle, P.; Meggitt, W.F.; Penner, D. (1975). Absorption, action, and translocation of glyphosate. *Weed Science*. 23, 235-240.

Sprankle, P.; Meggitt, W.F.; Penner, D. (1975). Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Science*. 23, 224-228.

Thebaud, C.; Abbott, R.J. (1995). Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. *American Journal of Botany, Columbus*. 82, 360-368.

Thill, D. C. and Lemerle, D. (2001). World wheat and herbicide resistance. In S. B. Powles and D. L. Shaner, eds. *Herbicide Resistance and World Grains*. New York: CRC Press. 165-194.

Thirunarayanan, K.; Zimdahl, R. L.; Smika, D. E. (1985). Chlorsulfuron adsorption and degradation in soil. *Weed Science*. 33, 558-563.

Tiedje, J. M.; Asuming-Brempong, S.; Nusslein, K.; Marsh, T. L.; Flynn, S. J. (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecology., Amsterdão*. 13, 109-22.

Tranel, P.J.; Wright, T.R. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? *Weed Science*.50, 700-712.

Turner, D.J.; Loader, M.P.C. (1974). Studies with solubilized herbicide formulations. 177-184.

Van Gessel, M.J. (2001). Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Science, Lawrence*. 49, 703-705.

Vargas, L., Bianchi, M.A., Rizzardi, M.A., Agostinetto, D. e Dal Magro, T. (2007). Buva (*Conyza bonariensis*) Resistente ao glyphosate na região sul do Brasil. *Planta Daninha, Viçosa-MG*. 25, 573-578.

Vargas, L.; Borém, A.; Silva, A.A. (2001). Herança da resistência aos herbicidas inibidores da ALS em populações da planta daninha *Euphorbia heterophylla*. *Planta Daninha*. 19, 331-336.

Vargas, L.; Silva, A.A.; Borém, A.; Rezende, S.T.; Ferreira, F.A.; Sedyama, T. (1999). Resistência de plantas daninhas a herbicidas. *Viçosa: UFV*, 131 p.

Vencill, W. K., Nichols, R. L., Webster, T. M., Soteris, J. K., Smith, C. M., Burgos, N. R., Johnson, W. G. and McClelland, M. R. (2012)a. *Herbicide Resistance: Toward an Understanding of Resistance Development and the Impact of Herbicide-Resistant Crops*. WSSA.

Vencill, W. K., William K., Vencill, Robert L. Nichols, Theodore M. Webster, John K. Soteris, Carol Mallory-Smith, Nilda R. Burgos, William G. Johnson, and Marilyn R. McClelland. (2012)b. *Herbicide Resistance: Toward an Understanding of Resistance Development and the Impact of Herbicide-Resistant Crops*. *Weed science*.

Vidal, R.A.; Fleck, N.G. (1997). Análise do risco da ocorrência de populações de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. *Planta Daninha*.15, 152-161.

Vidal, R.A.; Fleck, N.G. (1997). Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas. *Porto Alegre: Palotti*, 165p.

Vidal R.A., Kalsing, A., Goulart, I.C.G.R., Lamego, F.P. e Christoffoleti, P.J. (2007). Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. *Planta Daninha, Viçosa-MG*. 25, 309-315.

Vidal, R.A.; MEROTTO JR, A. (2001). Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. *Porto Alegre*. 138-148.

Wakelin, A. M., Preston, C. (2006). A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. *Weed research*. 46, 432-440.

Walker, S. (2004). Fleabane: summary of discussion and recommendations.

Ware, G. W. (1994). The Pesticide Book. 4th ed. Fresno, CA: Thomson Publications. 200 p.

Weed Science Society of America (WSSA). (1998). Herbicide resistance and herbicide tolerance defined. *Weed Technology* 12:789.

Werkheiser, W. O.; Anderson, S. (1996). Organic chemicals in the environment. *Journal of Environmental Quality*. 25, 809-814.

Wu, H.; Walker, S. (2004). Fleabane: fleabane biology and control. *IPNI*.

Yamada, T. e Castro, P. R. C. (2007). Efeito do Glifosato nas Plantas: Implicações Fisiológicas e Agronômicas. *IPNI*.

Zablotowicz, R.M. e Reddy, K.N. (2004). Impact of glyphosate and *Brady rhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview of *Journal of Environmental Quality*. 33, 825-831.

ANEXOS

1. Ensaio de dose-resposta aos herbicidas com planta inteira

Primeiro ensaio de dose resposta ao glifosato

Quadro A: Peso verde das plantas da população B8 (R) a 21 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-180 g s.a. L⁻¹; 1/2N-360 g s.a. L⁻¹; N-720 g s.a. L⁻¹; 2N-1440 g s.a. L⁻¹; 4N-2880 g s.a. L⁻¹; 8N-5760 g s.a. L⁻¹.

Peso Verde 11-06-2012 (21 DAA)	Modalidade						
B8	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose (g s.a. L⁻¹)	0	180	360	720	1440	2880	5760
I	5	3,6	1,57	0,2	0,3	0,2	0
II	5,9	5,5	0,95	2,5	0,9	0,7	0
III	5,4	3	2,5	2,2	0	0,3	0
IV	3,7	3,2	4,81	0	0,7	0,3	0
V	4,2	4,5	2,12	0,4	0	0,2	0
VI	2,1	3,8	1,68	1,1	0,7	0	0
VII	6,9	3,4	5,21	0,5	0,2	0	0,1
Média	4,7	3,8	2,69	1	0,4	0,3	0

Quadro B: Peso verde das plantas da população C (S) a 21 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-180 g s.a. L⁻¹; 1/2N-360 g s.a. L⁻¹; N-720 g s.a. L⁻¹; 2N-1440 g s.a. L⁻¹; 4N-2880 g s.a. L⁻¹; 8N-5760 g s.a. L⁻¹.

Peso Verde 11-06-2012 (21 DAA)	Modalidade						
C	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose (g s.a. L⁻¹)	0	180	360	720	1440	2880	5760
I	4,8	3,5	2,33	0,5	0,3	0,1	0,2
II	7	3,5	1,47	2,9	0,2	0	0,1
III	7,1	3,3	2,67	0,4	0	0	0,2
IV	8	3,4	0,37	1,6	0,1	0,2	0,3
V	8,7	1,2	0,36	0,1	1	0,3	0,1
VI	7,1	2,4	1,47	1	0,2	0,2	0,1
VII	6,8	1,7	2,74	0	0	0,1	0,2
Média	7,1	2,7	1,63	0,9	0,3	0,1	0,2

Quadro C: Peso seco das plantas da população B8 (R) a 23 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-180 g s.a. L⁻¹; 1/2N-360 g s.a. L⁻¹; N-720 g s.a. L⁻¹; 2N-1440 g s.a. L⁻¹; 4N-2880 g s.a. L⁻¹; 8N-5760 g s.a. L⁻¹.

Peso Seco 13-06-2012 (23 DAA)	Modalidade						
B8	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose (g s.a. L⁻¹)	0	180	360	720	1440	2880	5760
I	0,6	0,5	0,22	0,1	0,2	0,1	0
II	0,7	0,6	0,14	0,4	0,1	0,3	0
III	0,6	0,4	0,35	0,4	0	0,2	0
IV	0,4	0,4	0,59	0	0,2	0,1	0
V	0,4	0,6	0,28	0,1	0	0,1	0
VI	0,4	0,5	0,24	0,2	0,2	0	0
VII	0,8	0,4	0,72	0,1	0,1	0	0,1
Média	0,6	0,5	0,36	0,2	0,1	0,1	0

Quadro D: Peso seco das plantas da população C (S) a 23 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-180 g s.a. L⁻¹; 1/2N-360 g s.a. L⁻¹; N-720 g s.a. L⁻¹; 2N-1440 g s.a. L⁻¹; 4N-2880 g s.a. L⁻¹; 8N-5760 g s.a. L⁻¹.

Peso Seco 13-06-2012 (23 DAA)	Modalidade						
C	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose (g s.a. L⁻¹)	0	180	360	720	1440	2880	5760
I	0,5	0,5	0,36	0,1	0	0,1	0,1
II	0,9	0,6	0,23	0,5	0,1	0	0,1
III	0,8	0,4	0,46	0,1	0	0	0,1
IV	1	0,5	0,04	0,2	0,1	0,1	0,2
V	2,2	0,2	0,15	0,1	0,2	0,2	0,1
VI	1,3	0,4	0,27	0,2	0,2	0,2	0,1
VII	0,8	0,2	0,41	0	0	0,1	0,1
Média	1,1	0,4	0,27	0,2	0,1	0,1	0,1

Segundo ensaio de dose resposta ao glifosato

Quadro E: Peso verde das plantas da população B8 (R) a 21 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-180 g s.a. L⁻¹; 1/2N-360 g s.a. L⁻¹; N-720 g s.a. L⁻¹; 2N-1440 g s.a. L⁻¹; 4N-2880 g s.a. L⁻¹; 8N-5760 g s.a. L⁻¹.

Peso Verde	Modalidade						
20-06-2012 (21 DAA)							
B8	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose	0	180	360	720	1440	2880	5760
(g s.a. L⁻¹)							
I	4,1	3,6	3,1	3,63	0,92	0,25	0,36
II	4,77	2,15	5,59	2,89	1,6	0,41	0,11
III	2,5	3,64	0	1,69	1,54	0,15	0,4
IV	5,19	6,15	4,57	4,41	5,93	0,22	0,32
V	2,29	3,02	2,79	5,92	1,56	0,16	0,05
VI	2,81	3,1	2,48	1,92	0,14	0,14	0,15
VII	6,07	3,92	5,88	0,72	0,72	0,28	0,05
VIII	4,23	1,2	4,14	1,91	2,6	0,08	0,09
IX	6,35	3,78	1,95	2,48	3,04	0,25	0,08
X	4,93	2,49	4,02	5,14	0,1	0,33	0,2
Média	4,324	3,305	3,452	3,071	1,815	0,227	0,181

Quadro F: Peso verde das plantas da população C (S) a 21 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-180 g s.a. L⁻¹; 1/2N-360 g s.a. L⁻¹; N-720 g s.a. L⁻¹; 2N-1440 g s.a. L⁻¹; 4N-2880 g s.a. L⁻¹; 8N-5760 g s.a. L⁻¹.

Peso Verde	Modalidade						
20-06-2012 (21 DAA)							
C	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose	0	180	360	720	1440	2880	
(g s.a. L ⁻¹)							
I	6,15	5,4	0,04	0,23	1,1	0,15	0,34
II	3,36	2,58	2,45	0,09	1,06	0,17	0,1
III	3,22	5,6	3,59	1,18	1,49	0,08	0,45
IV	6,92	1,11	2,46	1,95	0,54	0,07	0,06
V	3,77	3,28	4,81	1,43	4,2	0,2	0,17
VI	5,04	3,96	2	2,02	0,85	0,04	0,21
VII	4,66	3,18	2,98	2,25	2,48	0,14	0,29
VIII	5,74	5,37	3,28	0,79	2,43	0	0,2
IX	7,7	3	0,67	0,98	3,89	0,09	0,57
X	4,24	5,68	3,96	3,39	1,73	0,14	0,18
Média	5,08	3,916	2,624	1,431	1,977	0,108	0,257

Quadro G: Peso seco das plantas da população B8 (R) a 23 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-180 g s.a. L⁻¹; 1/2N-360 g s.a. L⁻¹; N-720 g s.a. L⁻¹; 2N-1440 g s.a. L⁻¹; 4N-2880 g s.a. L⁻¹; 8N-5760 g s.a. L⁻¹.

Peso Seco	Modalidade						
22-06-2012 (23 DAA)							
B8	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose	0	180	360	720	1440	2880	5760
(g s.a. L ⁻¹)							
I	0,43	0,45	0,33	0,57	0,22	0,11	0,24
II	0,53	0,28	0,71	0,35	0,31	0,24	0,06
III	0,29	0,44	0	0,31	0,26	0,12	0,19
IV	0,54	0,75	0,73	0,61	0	0,17	0,18
V	0,24	0,36	0,36	0,78	0,24	0,16	0,05
VI	0,3	0,4	0,33	0,33	0,04	0,08	0,12
VII	0,68	0,41	0,74	0,14	0,26	0,22	0,03
VIII	0,42	0,11	0,6	0,35	0,36	0,05	0,08
IX	0,96	0,48	0,34	0,41	0,53	0,15	0,06
X	0,59	0,31	0,59	0,95	0,06	0,17	0,16
Média	0,498	0,399	0,473	0,48	0,228	0,147	0,117

Quadro H: Peso seco das plantas da população C (S) a 23 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-180 g s.a. L⁻¹; 1/2N-360 g s.a. L⁻¹; N-720 g s.a. L⁻¹; 2N-1440 g s.a. L⁻¹; 4N-2880 g s.a. L⁻¹; 8N-5760 g s.a. L⁻¹.

Peso Seco	Modalidade						
22-06-2012 (23 DAA)							
C	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose	0	180	360	720	1440	2880	5760
(g s.a. L ⁻¹)							
I	0,8	0,82	0,01	0,13	0,19	0,13	0,29
II	0,36	0,39	0,59	0,04	0,25	0,09	0,03
III	0,41	1,02	0,68	0,19	0,42	0,01	0,29
IV	0,92	0,11	0,37	0,33	0,21	0,06	0,06
V	0,43	1,06	0,76	0,24	0,65	0,08	0,14
VI	0,58	0,5	0,29	0,31	0,46	0,01	0,18
VII	0,51	0,41	0,46	0,42	0,4	0,09	0,21
VIII	0,81	0,64	0,76	0,19	0,4	0	0,12
IX	0,92	0,41	0,3	0,17	0,64	0,01	0,37
X	0,49	0,85	0,65	0,5	0,42	0,07	0,14
Média	0,623	0,621	0,487	0,252	0,404	0,055	0,183

Primeiro ensaio de dose resposta ao flazasulfurão

Quadro I: Peso verde das plantas da população B8 (R) a 21 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-10 g s.a. L⁻¹; 1/2N-20 g s.a. L⁻¹; N-40 g s.a. L⁻¹; 2N-80 g s.a. L⁻¹; 4N-160 g s.a. L⁻¹; 8N-320 g s.a. L⁻¹.

Peso Verde		Modalidade					
26-06-2012 (21 DAA)							
B8	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose							
(g s.a. L ⁻¹)	40						
I	1,46	0,03	0,03	0,01	0,1	0,06	0,14
II	1,86	0,01	0,07	0	0,09	0,11	0,06
III	1,86	0,04	0,1	0,01	0,04	0,01	0,15
IV	1,62	0,08	0,01	0,17	0,12	0,06	0,21
V	2,33	0,01	0,03	0,17	0,07	0,04	0,04
Média	1,826	0,034	0,048	0,072	0,084	0,056	0,12

Quadro J: Peso verde das plantas da população C (S) a 21 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-10 g s.a. L⁻¹; 1/2N-20 g s.a. L⁻¹; N-40 g s.a. L⁻¹; 2N-80 g s.a. L⁻¹; 4N-160 g s.a. L⁻¹; 8N-320 g s.a. L⁻¹.

Peso Verde	Modalidade						
26-06-2012 (21 DAA)							
C	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose							
(g s.a. L⁻¹)	40						
I	3,77	0,11	0,29	0,16	0,18	0,14	0,05
II	1,85	0,23	0,22	0,14	0,41	0,01	0,17
III	4,07	0,63	0,1	0,16	0,26	0,01	0,05
IV	3,79	0,12	0,07	0,56	0,16	0,05	0,02
V	8,87	0,21	0,29	0,05	0,2	0,11	0,27
Média	4,47	0,26	0,194	0,214	0,242	0,064	0,112

Quadro K: Peso seco das plantas da população B8 (R) a 23 DAA e para cada modalidade. T- Testemunha; 1/4N-10 g s.a. L⁻¹; 1/2N-20 g s.a. L⁻¹; N-40 g s.a. L⁻¹; 2N-80 g s.a. L⁻¹; 4N-160 g s.a. L⁻¹; 8N-320 g s.a. L⁻¹.

Peso Seco	Modalidade						
28-06-2012 (23 DAA)							
B8	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N
Dose							
(g s.a. L⁻¹)	40						
I	0,17	0	0,03	0	0,04	0,04	0,11
II	0,25	0	0,04	0	0,04	0,09	0,02
III	0,22	0,01	0,03	0	0,01	0	0,04
IV	0,2	0,05	0	0,08	0,05	0,03	0,09
V	0,28	0	0,03	0,07	0,02	0,02	0,02
Média	0,224	0,012	0,026	0,03	0,032	0,036	0,056

Quadro L: Peso seco das plantas da população C (S) a 23 DAA e para cada modalidade. T-Testemunha; 1/4N-10 g s.a. L⁻¹; 1/2N-20 g s.a. L⁻¹; N-40 g s.a. L⁻¹; 2N-80 g s.a. L⁻¹; 4N-160 g s.a. L⁻¹; 8N-320 g s.a. L⁻¹.

Peso Seco		Modalidade						
28-06-2012 (23 DAA)								
C	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N	
Dose				40				
(g s.a. L⁻¹)								
I	0,49	0,04	0,12	0,05	0,1	0,04	0	
II	0,24	0,12	0,03	0,05	0,1	0	0,08	
III	0,56	0,15	0,06	0,1	0,12	0	0,02	
IV	0,51	0	0,04	0,19	0,03	0	0	
V	0,46	0,09	0,19	0,01	0,1	0,03	0,11	
Média	0,452	0,08	0,088	0,08	0,09	0,014	0,042	

Segundo ensaio de dose resposta ao flazasulfurão

Quadro M: Peso verde das plantas da população B8 (R) a 21 DAA e para cada modalidade. T-Testemunha; 1/4N-10 g s.a. L⁻¹; 1/2N-20 g s.a. L⁻¹; N-40 g s.a. L⁻¹; 2N-80 g s.a. L⁻¹; 4N-160 g s.a. L⁻¹; 8N-320 g s.a. L⁻¹.

Peso Verde		Modalidade						
02-07-2012 (21 DAA)								
B8	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N	
I	0,7	0,03	0	0	0,01	0,03	0	
II	1,13	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	
III	0,44	0,03	0,01	0	0,01	0,01	0,03	
IV	0,26	0	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01	
V	0,72	0,07	0,02	0,02	0,03	0,01	0,02	
Média	0,65	0,028	0,012	0,014	0,016	0,016	0,016	

Quadro N: Peso verde das plantas da população C (S) a 21 DAA e para cada modalidade. T-Testemunha; 1/4N-10 g s.a. L⁻¹; 1/2N-20 g s.a. L⁻¹; N-40 g s.a. L⁻¹; 2N-80 g s.a. L⁻¹; 4N-160 g s.a. L⁻¹; 8N-320 g s.a. L⁻¹.

Peso Verde		Modalidade						
02-07-2012 (21 DAA)								
B8	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N	
I	0,3	0,06	0	0	0	0	0	
II	0,35	0,01	0	0	0	0	0,03	
III	0,33	0,01	0	0	0	0,02	0	
IV	0,24	0,07	0,01	0,01	0	0,04	0	
V	0,38	0,03	0	0	0	0,04	0,02	
Média	0,32	0,036	0,002	0,002	0	0,02	0,01	

Quadro O: Peso seco das plantas da população B8 (R) a 23 DAA e para cada modalidade. T-Testemunha; 1/4N-10 g s.a. L⁻¹; 1/2N-20 g s.a. L⁻¹; N-40 g s.a. L⁻¹; 2N-80 g s.a. L⁻¹; 4N-160 g s.a. L⁻¹; 8N-320 g s.a. L⁻¹.

Peso Seco		Modalidade						
04-07-2012 (23 DAA)								
B8	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N	
I	0,1	0,01	0	0	0,01	0,01	0	
II	0,17	0	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	
III	0,03	0,02	0,01	0	0,01	0,01	0,01	
IV	0,03	0	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	
V	0,11	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	
Média	0,088	0,012	0,012	0,01	0,012	0,012	0,008	

Quadro P: Peso seco das plantas da população C (S) a 23 DAA e para cada modalidade. T-Testemunha; 1/4N-10 g s.a. L⁻¹; 1/2N-20 g s.a. L⁻¹; N-40 g s.a. L⁻¹; 2N-80 g s.a. L⁻¹; 4N-160 g s.a. L⁻¹; 8N-320 g s.a. L⁻¹.

Peso Seco		Modalidade						
04-07-2012 (23 DAA)								
C	T	¼ N	1/2 N	N	2N	4N	8N	
I	0,04	0,01	0	0	0	0	0	
II	0,06	0	0	0	0	0	0,03	
III	0,04	0	0	0	0	0,02	0	
IV	0,04	0,01	0,01	0,01	0	0,04	0	
V	0,04	0,01	0	0	0	0,04	0,02	
Média	0,044	0,006	0,002	0,002	0	0,02	0,01	

2. Ensaio de determinação do shiquimato

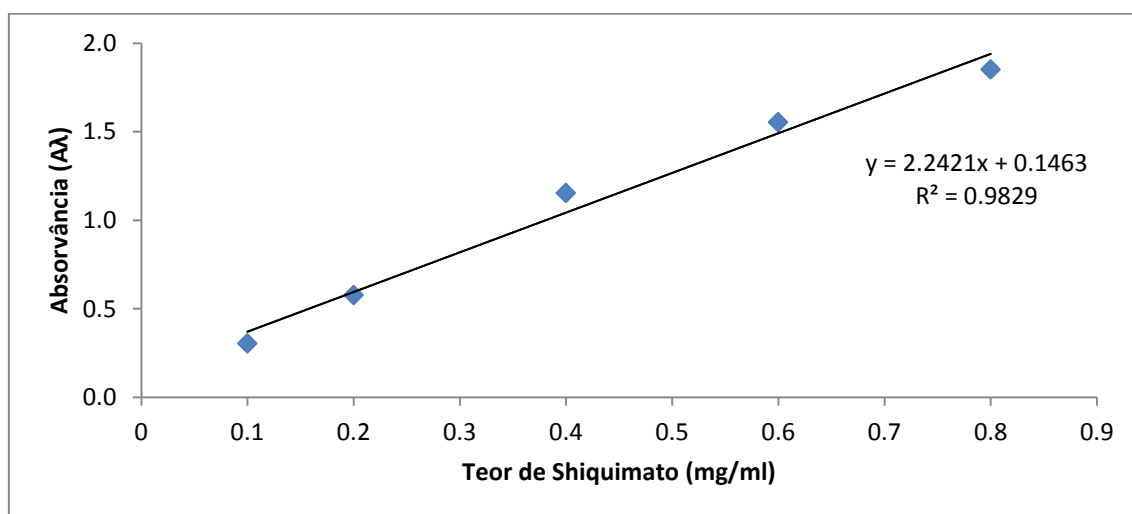


Figura A: Reta de calibração dos valores de absorvância obtidos a 380 nm para os padrões de shiquimato.